

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005504 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/90, 15/82 (74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, ., 67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007027 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juli 2003 (02.07.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 102 30 220.0 4. Juli 2002 (04.07.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BÖRNKE, Frederik [DE/DE]; Am Heiligen Brunnen 2, 06484 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). TSCHIRSCH, Bettina [DE/DE]; Ballstr. 26a, 06484 Quedlinburg (DE). NEUHAUS, Horst-Ekkehard [DE/DE]; Im Braumenstück 13, 67659 Kaiserslautern (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
- mit internationalem Recherchenbericht
 - vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

536887
021209

(54) Title: METHODS FOR OBTAINING PATHOGEN RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for creating or increasing pathogen resistance in plants by preferably pathogen-inducible expression of a sucrose isomerase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

WO 2004/005504 A1

KO

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

0 (DS)

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000053687	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/ 07027	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02/07/2003	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/07/2002
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerisierter Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerisierter Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezelpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerisierter Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N9/90 C12N15/82

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EP0-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02 27003 A (KUNZ MARKWART ;MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG (DE); VOGEL MANFRED) 4. April 2002 (2002-04-04) Seite 14, Zeile 5 - Zeile 13 ---	8,9, 11-15
X	BOERNKE FREDERIK ET AL: "Potato tubers as bioreactors for palatinose production" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 96, Nr. 1, 13. Juni 2002 (2002-06-13), Seiten 119-124, XP002259504 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ---	8,9, 11-15
X	WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) Beispiel 6 ---	8,9, 11-15
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/11/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27. Juli 1995 (1995-07-27) ---	
A	WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) ---	
A	ROCHA-SOSA M ET AL: "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 8, Nr. 1, 1989, Seiten 23-29, XP002038303 ISSN: 0261-4189 Seite 28, linke Spalte, letzter Absatz -----	

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07027

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0227003	A	04-04-2002	DE 10047286 A1 04-04-2002
		AU 7639801 A 08-04-2002	
		CA 2421618 A1 19-03-2003	
		WO 0227003 A1 04-04-2002	
		EP 1322772 A1 02-07-2003	
WO 0159136	A	16-08-2001	DE 10006462 A1 13-09-2001
		AU 3547401 A 20-08-2001	
		WO 0159136 A1 16-08-2001	
		EP 1272645 A1 08-01-2003	
WO 9520047	A	27-07-1995	DE 4414185 C1 07-09-1995
		AU 1155495 A 27-07-1995	
		AU 688848 B2 19-03-1998	
		AU 1534995 A 08-08-1995	
		BR 9500271 A 17-10-1995	
		CA 2140613 A1 20-07-1995	
		DE 4447471 A1 31-08-1995	
		DE 4447472 A1 14-09-1995	
		WO 9520047 A2 27-07-1995	
		EP 0740706 A1 06-11-1996	
		FI 950187 A 20-07-1995	
		FI 962891 A 18-07-1996	
		JP 7250693 A 03-10-1995	
		NO 950194 A 20-07-1995	
		US 2003087416 A1 08-05-2003	
		US 5786140 A 28-07-1998	
		US 5985622 A 16-11-1999	
WO 0159135	A	16-08-2001	DE 10045113 A1 16-08-2001
		AU 3546001 A 20-08-2001	
		WO 0159135 A1 16-08-2001	
		EP 1263971 A1 11-12-2002	
		US 2003159181 A1 21-08-2003	

596 075

PCT/EP2003/007027

Translation

PATENT COOPERATION TREATY



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0000053687	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/007027	International filing date (day/month/year) 02 July 2003 (02.07.2003)	Priority date (day/month/year) 04 July 2002 (04.07.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/90		
Applicant SUNGENE GMBH & CO. KGAA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 18 December 2003 (18.12.2003)	Date of completion of this report 20 September 2004 (20.09.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report refers to the international search report citations. The numbering (D1-D6) corresponds to the sequence in which the documents appear in the search report.

Subject matter of the invention

The invention relates to the expression of sucrose isomerase in transgenic plants under the control of epidermis-specific or pathogen-inducible promoters. The plants show a reduced susceptibility to pathogens, in particular fungi and nematodes.

Novelty and inventive step (PCT Article 33)



The prior art hitherto does not show a connection between the recombinant expression of sucrose isomerase, the formation of non-cariogenic sugars, such as, for example, palatinose, in transgenic plants, and an increase in the resistance to pests. Consequently, novelty and inventive step are acknowledged for the methods of claims 1-7 and for the expression cassettes and transgenic organisms of claims 8-15.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000053687	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02.07.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04.07.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/90		
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA, et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Bescheids</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priorität</p> <p>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		
Datum der Einreichung des Antrags 18.12.2003	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.09.2004	
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T Tel. +49 89 2399-7703 	

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-61 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Sequenzen, Seiten

1-50 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-15 eingegangen am 12.08.2004 mit Schreiben vom 09.08.2004

Zeichnungen, Blätter

1/8-8/8 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027

- ☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1. Feststellung | |
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-15
Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-15
Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-15
Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Dieser Bericht bezieht sich auf die im Internationalen Recherchenbericht aufgeführten Dokumente. Die Nummerierung (D1-D6) entspricht ihrer Reihenfolge im Recherchenbericht.

Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung beschreibt die Expression von Saccharoseisomerase in transgenen Pflanzen unter Kontrolle von epidermis-spezifischen bzw. pathogen-induzierbaren Promotoren. Die Pflanzen zeigen daraufhin eine verringerte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen, insbesondere Pilzen und Nematoden.

Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Artikel 33 PCT)

Ein Zusammenhang zwischen der rekombinanten Expression von Saccharoseisomerase, der Bildung nicht-kariogener Zucker, wie z.B. Palatinose, in transgenen Pflanzen und einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Schädlingen ist im Stand der Technik bislang unbekannt.

Aufgrund dessen können Neuheit und erfinderische Tätigkeit für die Verfahren der Ansprüche 1-7, sowie die Expressionskassetten und transgenen Organismen der Ansprüche 8-15 anerkannt werden.

Geänderte Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen mindestens ein Pa-
thogen in pflanzlichen Organismen; wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst
sind
- a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in ei-
nem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle
desselben, und
- b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Ver-
gleich zum Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pa-
thogen besteht oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase beschrieben wird
durch
- i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
- ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10,
12, 14, 16, 18 oder 36, oder
- iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Expression der Sac-
charoseisomerase gewährleistet wird durch eine transgene Expressionskassette
umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe
bestehend aus:
- a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID
NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36, und
- b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von min-
destens 40% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16,
18, 20, 22 oder 26 aufweisen, und
- c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19,
21 oder 35, und
- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degene-
riert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer
Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21
oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nuklein-
säuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35
hybridisieren.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase
unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder ge-
webespezifischen Promotors exprimiert wird.

0817/427/2002 Ko

09.08.2004

Geänderte Ansprüche Vers. 2

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 15 8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
- 20 9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.
- 25 11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
- 30 12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
- 35 13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 40 14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
- 45 15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT



21 SEP 2004

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT PCT
(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000053687	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 02.07.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04.07.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N9/90		
Anmelder SUNGENE GMBH & CO. KGAA, et al.		

1. Dieser Internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
- I ☒ Grundlage des Bescheids
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 18.12.2003	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.09.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T Tel. +49 89 2399-7703 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-61 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Sequenzen, Seiten

1-50 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-15 eingegangen am 12.08.2004 mit Schreiben vom 09.08.2004

Zeichnungen, Blätter

1/8-8/8 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung, .Seiten:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07027

- ☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-15 |
| | Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-15 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-15 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Dieser Bericht bezieht sich auf die im Internationalen Recherchenbericht aufgeführten Dokumente. Die Nummerierung (D1-D6) entspricht ihrer Reihenfolge im Recherchenbericht.

Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung beschreibt die Expression von Saccharoseisomerase in transgenen Pflanzen unter Kontrolle von epidermis-spezifischen bzw. pathogen-induzierbaren Promotoren. Die Pflanzen zeigen daraufhin eine verringerte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen, insbesondere Pilzen und Nematoden.

Neuheit und erfinderische Tätigkeit (Artikel 33 PCT)

Ein Zusammenhang zwischen der rekombinanten Expression von Saccharoseisomerase, der Bildung nicht-kariogener Zucker, wie z.B. Palatinose, in transgenen Pflanzen und einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Schädlingen ist im Stand der Technik bislang unbekannt.

Aufgrund dessen können Neuheit und erfinderische Tätigkeit für die Verfahren der Ansprüche 1-7, sowie die Expressionskassetten und transgenen Organismen der Ansprüche 8-15 anerkannt werden.

Geänderte Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen mindestens ein Pa-
thogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst
sind
- a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in ei-
nem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle
desselben, und
- b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Ver-
gleich zum Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pa-
thogen besteht oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase beschrieben wird
durch
- i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
- ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10,
12, 14, 16, 18 oder 36, oder
- iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Expression der Sac-
charoseisomerase gewährleistet wird durch eine transgene Expressionskassette
umfassend mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe
bestehend aus:
- a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID
NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36, und
- b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von min-
destens 40% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16,
18, 20, 22 oder 26 aufweisen, und
- c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19,
21 oder 35, und
- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degene-
riert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer
Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21
oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nuklein-
säuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35
hybridisieren.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase
unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder ge-
webespezifischen Promotors exprimiert wird.

0817/427/2002 Ko

09.08.2004

Geänderte Ansprüche Vers. 2

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 15 8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
- 20 9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.
- 25 11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
- 30 12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
- 35 13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 40 14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
- 45 15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

59

We claim:

1. A method for generating or increasing the resistance to at least one pathogen in plant organisms, which comprises the following process steps
 - a) transgenic expression of a protein with sucrose isomerase activity in a plant organism and
 - b) selection of those plant organisms in which, as opposed or as compared to the original plant, the resistance to at least one pathogen exists or is increased.
2. The method according to claim 1, wherein the sucrose isomerase is described by
 - i) a protein as shown in SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 or 36, or
 - ii) a functional equivalent to a protein as shown in SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 or 36, or
 - iii) a functionally equivalent fragment to a protein as shown in i) and ii).
3. The method according to claim 1 or 2, wherein the expression of the sucrose isomerase is ensured by a transgenic expression cassette comprising at least one nucleic acid sequence selected from the group consisting of:
 - a) nucleic acid sequences encoding an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 or 36, and
 - b) nucleic acid sequences encoding proteins with at least 40% homology with the sequence as shown in SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 or 36, and
 - c) nucleic acid sequences as shown in SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 or 35, and
 - d) nucleic acid sequences which are degenerated to a nucleic acid sequence of c), and

Dr. + Seq.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

60

- e) nucleic acid sequences with at least 40% homology with a nucleic acid sequence as shown in SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 or 35, and
- 5 f) nucleic acid sequences which hybridize with a complementary strand of the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 or 35.
4. The method according to any of claims 1 to 3, wherein the su-
10 crose isomerase is expressed under the control of a pathogen-inducible promoter which is functional in plants.
5. The method according to any of claims 1 to 4, wherein the
15 pathogen is selected from the group consisting of fungi and nematodes.
6. The method according to any of claims 1 to 5, wherein the
20 pathogen is selected from the group of the fungi consisting of Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomycetes, Zygomycetes, Basidiomycota and Deuteromycetes.
7. The method according to any of claims 1 to 6, wherein the
25 plant is selected from the group consisting of potato, beet, sugar beet, tomato, banana, carrot, sugar cane, strawberry, pineapple, paw paw, soybean, oats, barley, wheat, rye, triticale, sorghum and millet, and maize.
8. A transgenic expression cassette comprising a nucleic acid
30 sequence encoding a sucrose isomerase, in operable linkage with a pathogen-inducible promoter which is functional in plants.
9. The transgenic expression cassette according to claim 8,
35 wherein the sucrose isomerase is defined as claimed in one of claims 2 or 3.
10. The transgenic expression cassette according to claim 8 or 9,
40 wherein the pathogen-inducible promoter is selected from the group consisting of one of the sequences as shown in SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 or 34.
11. A transgenic expression vector comprising the transgenic expression cassette according to any of claims 8 to 10.

REPLACED BY
ART 34 Amdt

61

12. A transgenic organism comprising the transgenic expression cassette according to any of claims 8 to 10 or a transgenic expression vector as claimed in claim 11.

5 13. The transgenic organism according to claim 12, selected from the group of the plants consisting of potato, beet, sugar beet, tomato, banana, carrot, sugar cane, strawberry, pineapple, paw paw, soybean, oats, barley, wheat, rye, triticale, sorghum and millet, and maize.

10

14. A transgenic crop product, propagation material, cells, organs, parts, calli, cell cultures, seeds, tubers, sets or transgenic progeny of the transgenic organism according to one of claims 12 or 13.

15

15. The use of the transgenic organism according to one of claims 12 or 13, or transgenic crop products, propagation material, cells, organs, parts, calli, cell cultures, seeds, tubers, derived therefrom or transgenic progeny according to claim 14 for the production of palatinose.

20

25

30

35

40

45

516,075

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005504 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/90, (74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, ., 67056 Ludwigshafen (DE). 15/82
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007027 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juli 2003 (02.07.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 102 30 220.0 4. Juli 2002 (04.07.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BÖRNKE, Frederik [DE/DE]; Am Heiligen Brunnen 2, 06484 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). TSCHIERSCHE, Bettina [DE/DE]; Ballstr. 26a, 06484 Quedlinburg (DE). NEUHAUS, Horst-Ekkehard [DE/DE]; Im Braumenstück 13, 67659 Kaiserslautern (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
- mit internationalem Recherchenbericht
 - vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHODS FOR OBTAINING PATHOGEN RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for creating or increasing pathogen resistance in plants by preferably pathogen-inducible expression of a sucrose isomerase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

WO 2004/005504 A1

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

- 10 Palatinose (Isomaltulose) und Trehalulose werden großtechnisch aus Saccharose durch eine enzymatische Umlagerung unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen hergestellt. Dabei wird die zwischen den Monosacchariden des Disaccharids Saccharose bestehende ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zu einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung
- 15 bei Palatinose bzw. einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung bei Trehalulose isomerisiert. Diese Umlagerung von Saccharose zu den beiden nicht-kariogenen Disacchariden erfolgt unter Katalyse des bakteriellen Enzyms Saccharoseisomerase, auch Saccharosemutase genannt. Entsprechende Sequenzen sind beispielsweise in WO 95/20047
- 20 (US 5,786,140; US 5,985,622) beschrieben.

- Ferner sind beschrieben Saccharoseisomerasen aus *Erwinia rhapontici* (palI Gen, GenBank Acc.-No.: AF279281; Börnke et al. (2001) J Bacteriol 183(8):2425-2430) und *Klebsiella* sp. Strain
- 25 LX3 (GenBank Acc.-No.: AY040843; Zhang et al. (2002) Appl Environ Microbiol (68):2676-2682).

- WO 01/59136 beschreibt Verfahren zur direkten Herstellung nicht-kariogener Zucker direkt in transgenen Pflanzen, die rekombinante
- 30 Nukleinsäuremoleküle kodierend für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Saccharoseisomerase enthalten. Beschrieben sind Expressionskonstrukte für besagte Saccharoseisomerase zur Expression in Pflanzen, sowie die mit denselben transformierten transgenen Pflanzen.

35

- WO 01/59135 beschreibt Verfahren zur Beeinflussung der Pollenentwicklung unter Verwendung von antheren-, tapetum oder pollen-spezifisch exprimierten Saccharoseisomerasen. Die konstitutive Expression der Saccharoseisomerase in Pflanzen hat jedoch nach-
- 40 teilige Wirkung auf das Wachstum der Pflanze (Börnke F et al. (2002) Planta 214:356-364).

- Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel
- 45 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehr-

- mechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken.
- 15 Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen unter Kontrolle des 35 S CaMV Promoters (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promoters
- 10 (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.
- 15 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endo-
- 20 genen Botenstoffen wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward, et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes, et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisobenzonitril (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-
- 25 S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J. 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hoch-regulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
- 30 In Gerste ist bereits seit längerem der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und vor allem rassen-unspezifische Resistenz beispielsweise gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjær MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Das Mlo-Gen wurde erst kürzlich kloniert (Büschges R et al. (1997) Cell :695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000)
- 40 Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung von Mlo-Genen zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Unklar ist, ob ein Mlo-basierter Ansatz auch in dikotyledonen Pflanzen praktikabel ist.

3

Generell leben pflanzenpathogene Pilzarten saprophytisch oder parasitisch. Letztere sind - zumindest in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus - auf ein Wirkstoffangebot (z.B. ein Angebot an Vitaminen, Kohlenhydraten usw.) angewiesen, wie es in dieser Form
5 nur von lebenden Pflanzenzellen bereitgestellt werden kann. Der Fachmann unterscheidet parasitäre Pilze in nekrotrophe, hemibiotrophe und biotrophe. Bei nekrotrophen pilzlichen Parasiten führt die Infektion zur Gewebeerstörung und damit zum Tod der Pflanze. Diese Pilze sind meist nur fakultativ parasitär; sie können sich
10 ebenso gut saprophytisch in totem oder absterbendem Pflanzenmaterial vermehren.

Biotrophe pilzliche Parasiten sind dadurch charakterisiert, dass Parasit und Wirt, zumindest über längere Zeiträume hinweg,
15 zusammenleben. Der Pilz entnimmt dem Wirt Nährstoffe, tötet ihn jedoch nicht ab. Die meisten biotrophen Pilze sind obligate Parasiten. Hemibiotrophe Pilze leben zeitweise biotroph und töten den Wirt zu einem späteren Zeitpunkt ab, d.h. sie wechseln in eine nekrotrophe Phase.

20

Einer weitere große Gruppe biotropher pflanzlicher Pathogene von enormer agro-ökonomischer Bedeutung stellen Nematoden dar. Pflanzenpathogene Nematoden entnehmen ihre Nahrung aus den äußeren pflanzlichen Gewebeabschnitten (Ektoparasiten) oder nach
25 dem Eindringen in die Pflanze aus tiefer liegenden Zellschichten (Endoparasiten). Bei den endoparasitären Wurzel nematoden unterscheidet man nach ihrer Lebens- und Ernährungsweisen zwischen zwei Gruppen: Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) und Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten). Bei
30 beiden Gruppen handelt es sich um obligate biotrophe Parasiten, die in den Wurzeln die Bildung spezieller Nährzellen induzieren. Bei diesen Nährzellen handelt es sich um Pflanzenzellen, deren Stoffwechsel von den Nematoden so verändert wurde, dass sie gezielt der Ernährung der sich entwickelten Nematoden dienen. Endo-
35 parasitäre Wurzel nematoden sind in ihrer Entwicklung von diesen Nährzellen absolut abhängig (zur Übersicht siehe Sijmons et al. (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32: 235-259). Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) verbleiben an der Parasitierungsstelle in der Wurzel (sessile Endoparasiten)
40 wandeln die sie umgebenden Zellen durch Protoplastenfusion bei teilweiser Zellwandauflösung in Syncytien um. Diesen Nährzellen, die im Zentralzylinder der Wurzel gebildet werden, entnehmen die Nematoden ihre Nahrung und schwellen dabei stark an. Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) verbleiben ebenfalls an der
45 einmal gewählten Parasitierungsstelle und veranlassen die Bildung von Nährzellen, welche aber, anders als bei den Zystenbildenden Nematoden aus mehreren, durch synchrone Kernteilungen ohne Zell-

wandbildung sich entwickelnden vielkernigen Riesenzellen bestehen (Fenoll and Del Campo (1998) *Physiol. Mol. Biol. Plants* 4:9-18). Die Bildung der Nährzellensysteme wird durch die Signalmoleküle im Speichel der Nematoden induziert. Es ist bekannt, dass während dieser Differenzierungsprozesse eine Reihe von Pflanzengen
5 ihr Expressionsprofil stark verändern. In der Literatur sind Promotoren beschrieben, die speziell in Nährzellsystem (Syncytien) induziert werden. Beispielfhaft seien zu nennen der $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) *Science* 263:221-223,
10 der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Ecobar et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12: 440-449), sowie Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832).

WO 94/10320 beschreibt DNA Konstrukte zur Expression von Genen,
15 die als Inhibitoren endogener Pflanzengene wirken (z.B. ATP Synthase, Cytochrom C, Pyruvatkinase), unter der Kontrolle von Nematoden-induzierter Promotoren in den Syncytien.

Trotz einiger Fortschritte in manchen Bereichen der Pflanzen-
20 biotechnologie, sind die Erfolge beim Erzielen einer Pathogenresistenz in Pflanzen sehr begrenzt und bislang nur gegen Viren hinreichend belegt. Insbesondere Ernteverluste infolge von Pilz- und Nematodenbefall stellen ein ernstzunehmendes Problem dar und erfordern nach wie vor den intensiven Einsatz von Fungiziden und
25 Nematoziden. Dennoch sind die damit zusammenhängenden Probleme nur unzureichend in den Griff zu bekommen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine
30 effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrums von Pathogenen, bevorzugt von Pilzen und Nematoden, in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

35 Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

40 a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und

5

- b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen:- im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle pflanzlichen Organismen angewendet werden, die Saccharose produzieren. Dazu zählen alle höheren Pflanzen. Es wurde überraschender Weise beobachtet, dass auf Kartoffelscheiben transgener Kartoffelpflanzen, in deren Knollen aufgrund transgener Expression einer
- 10 Saccharoseisomerase Saccharose in Palatinose umgewandelt wird, das Wachstum des Pilzes *Alternaria* signifikant gehemmt ist.

Ferner kann beobachtet werden, dass die transgene Expression der Saccharoseisomerase auch eine Resistenz gegen Nematoden bewirkt.

- 15 Insbesondere eine durch endoparasitären Wurzel nematoden hervorgerufene Syncytien-spezifische Expression der Saccharoseisomerase-sequenz bewirkt eine deutliche Reduktion des Nematodenbefalls.

- Da zahlreiche Pathogene, insbesondere Pilze und Nematoden, Palatinose nicht verstoffwechseln können, ist eine Überwindung der
- 20 Resistenz durch einfache Mutation in den Pathogenen kaum möglich, da hierfür die Gewinnung einer neuen Enzymaktivität erforderlich wäre.

- 25 "Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität" meint im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Protein, das als "wesentliche Eigenschaft" die Isomerisierung von Saccharose zu anderen Disacchariden katalysiert, wobei die $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zwischen Glukose und Fruktose in der Saccharose in eine andere
- 30 glykosidische Bindung zwischen zwei Monosaccharideinheiten überführt wird, insbesondere in eine $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung und/oder einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung.

- Eine Saccharoseisomerase-Aktivität kann indirekt über die
- 35 Analyse der resultierenden Kohlenhydrate (z.B. Palatinosegehalt) in der dem Fachmann geläufigen Weise beispielsweise durch Analyse ethanolischer Extrakte entsprechenden biologischen Materials (z.B. Material einer transgenen Pflanze oder eines Mikroorganismus) gemessen werden. Besagte Extrakte können z.B.
- 40 durch HPLC analysiert und die Zucker anhand der entsprechenden Standards identifiziert werden. Ein Verfahren zur Analyse ist z.B. in WO 01/59136 beschrieben. So werden zum Nachweis von Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzenextrakten Blattscheiben mit einem Durchmesser von ca. 0,8 cm für 2 h bei 70°C mit 100 μ l
- 45 80 % Ethanol und 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) extrahiert. Für die Analyse eines Aliquots dieser Extrakte kann ein HPLC-System z.B. der Firma Dionex verwendet werden, welches mit einer PA-1 (4 x

6

250 mm)-Säule und einen gepulsten elektrochemischen Detektor ausgestattet werden kann. Vor der Injektion können die Proben für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert werden. Die Zucker können anschließend mit einem 10 minütigen Gradienten von 0 bis 1 M Natriumacetat nach 4 Minuten bei 150 mM NaOH und einer Durchflussrate von 1 ml/min eluiert werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Zucker können die entsprechenden Standards der Firma Sigma verwendet werden.

- 10 Besonders bevorzugt wird unter einem Protein mit Saccharose-isomerase Aktivität ein Protein verstanden, das als wesentliche Eigenschaft zur Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose und/oder Trehalulose befähigt ist. Dabei beträgt der Anteil von Palatinose und Trehalulose an den gesamten Disacchariden, die durch Isomerisierung von Saccharose gebildet werden mindestens 2 %, bevorzugt mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 %.

- 20 Die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharose-isomerase-Aktivität, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder nach herkömmlichen Verfahren synthetisiert werden.

- Beispiele für Organismen, deren Zellen Proteine mit Saccharose-isomerase-Aktivität sowie die dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, sind insbesondere Mikroorganismen der Gattungen *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Insbesondere sind hier folgende Beispiele für solche Mikroorganismen zu nennen:

- 30 *Protaminobacter rubrum* (CBS 547, 77), *Erwinia rhapontici* (NCPBP 1578), *Serratia plymuthica* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285), *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-52 If (ATCC 1083 0a), *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619), *Agrobacterium radiobacter* MX-232 (FERM 12397 bzw. FERM BP 35 3620), *Klebsiella* subspezies und *Enterobacter* spezie.

- In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharose-isomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- i) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und

ii) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und

5 iii) Nukleinsäuresequenzen kodierend für funktionell äquivalente Fragmente zu einem Protein gemäß i) und ii).

Weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, sind im Stand der Technik bekannt und stehen dem Fachmann somit für den Transfer auf Pflanzenzellen zur Verfügung. So sind z.B. Sequenzen aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter species SZ 62* und *Pseudomonas mesoacidophila MX-45* in WO 95/20047 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich
15 Bezug genommen, sowohl hinsichtlich der offenbarten Sequenzen selbst, als auch im Hinblick auf die Auffindung und Charakterisierung dieser und weiterer Saccharoseisomerase kodierender Sequenzen aus anderen Quellen.

20 Weitere für Saccharoseisomerasen kodierende DNA-Sequenzen kann der Fachmann u.a. den Gendatenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Durchmustern nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Saccharoseisomerase kodierende
25 Nukleinsäuresequenzen aus anderen Organismen mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann z.B. geeignete Hybridisierungssonden von den bekannten Saccharoseisomerase-Sequenzen ableiten und für das Durchmustern
30 von cDNA-und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, aus dem ein neues Saccharoseisomerase-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen (siehe z.B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning:
35 A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Ebenso ist der Fachmann in der Lage, anhand bekannter Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen geeignete - gegebenenfalls degenerierte - Oligonukleotide als Primer für Klonierungen neuer Gene mittels PCR zu synthetisieren
40 und erfolgreich einzusetzen.

Proteine mit Saccharoseisomerase Aktivität sowie die dafür kodierenden Nukleinsäuresequenzen kann der Fachmann in der ihm geläufigen Weise unschwer aus solchen Organismen isolieren, in
45 denen solche Aktivitäten detektiert wurden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (z.B. DE 44 14 185). So kann z.B. durch partiellen Verdau von genomischer DNA eines solchen Organismus

(bevorzugt eines Mikroorganismus) und Einbringen der erhaltenen Fragmente in geeignete E.coli-Vektoren und Transformation eine Genbank gewonnen werden, deren Klone genomische Abschnitte zwischen 2 und 15 kb des Spenderorganismus enthalten. Aus E.coli-
5 Zellen, die diese Plasmide tragen, werden durch Plattierung auf McConkey-Palatinosemedium solche ausgewählt, die eine Rotfärbung der Kolonie aufweisen. Die in diesen Zellen enthaltene Plasmid-DNA wird in eine E.coli-Mutante überführt, die auf Galactose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann (z.B. ED 8654, Sambrook
10 et al., supra, Seiten A9-A13). Diese transformierte Zelllinie ist zur Identifikation von Palatinoseproduzenten in der wie oben beschrieben hergestellten Genbank aus DNA des Spenderorganismus in der Lage. Zur Identifikation der gesuchten Palatinose-bildenden Klone werden die Zellen der Genbank
15 auf Minimal-Salzmedien mit Galactose und Saccharose vereinzelt und angezogen. Nach Replika-Stempeln der Kolonien auf Platten mit dem gleichen Medium werden die Zellen durch Bedampfung mit Toluol abgetötet. Anschließend werden Zellen des Screeningstamms als Rasen in Minimalsalz-Weichagar ohne C-Quellenzusatz über
20 die Kolonien der Genbank ausgebracht und bebrütet. Es entsteht signifikantes Wachstum der Zellen des Screeningstamms nur am Ort von Zellen der Genbank, die Palatinose produziert haben. Bei Prüfung der Zellen der Replikakontrolle ergibt sich der Gehalt an Isomerase. Diese so identifizierten E.coli-Klone sind
25 auf Palatinose als einziger C-Quelle im Medium nicht wachstumsfähig, zeigen im Test der ganzen Zellen oder in Zellextrakten keine Fähigkeit zur Spaltung von Saccharose, bilden aber unter diesen Bedingungen und ohne Zusatz von Saccharose zum Medium bei der Anzucht Palatinose.

30

Alternativ können Isomerase-Klone auch unter Verwendung eines PCR-Fragments identifiziert werden. Verwendet man Plasmid-DNA den so identifizierten E.coli-Klonen als Sonden zur Hybridisierung an Filtern mit immobilisierter DNA aus dem
35 Spenderorganismus, lassen sich die Genbereiche, die Isomerase-gene tragen, nachweisen und gezielt verfügbar machen.

Funktionelle Äquivalente der im Rahmen dieser Erfindung offenbarten Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität umfassen
40 bevorzugt solche aus anderen Organismen, beispielsweise aus Mikroorganismen, deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium, Klebsiella und Enterobacter. Diese können z.B.
45 durch Datenbanksuche in Sequenzdatenbanken wie GenBank oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Banken - z.B. unter Verwendung der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder eines Teils derselben als

Suchsequenz bzw. Sonde - aufgefunden werden. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

- 5 So kann der Fachmann, falls erwünscht, zusätzlich mittels Routinetechniken, verschiedenartige Mutationen in die die Saccharoseisomerase kodierende DNA-Sequenz einführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. So ist es z.B. möglich, gezielt
- 10 Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind in der Literatur beschrieben und dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Braun et al. (1992) EMBO J 11:3219-3227; Wolter F et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:846-850; Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1:95-106).

- Weiterhin ist auch die Einführung von Punktmutationen an Positionen denkbar, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielsweise auf die Enzymaktivität
- 20 oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr den normalerweise in der Zelle herrschenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen. Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat-
- 25 oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-, Temperatur- und/oder pH-Profil aufweisen.

- Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a.
- 30 die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codonpräferenz ("codon usage") der Zielpflanze, also der aufgrund der Expression der Saccharoseisomerase-Nukleinsäuresequenz pathogenresistenten Pflanze bzw. Pflanzenzelle, anzupassen und die Expression dadurch zu optimieren.

- 35 Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-
- 40 Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al. (1989), vide supra) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente - wo erforderlich - Adapter oder Linker angefügt
- 45 werden. Ferner können mittels enzymatischer und anderer Manipulationen passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung gestellt oder überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen

10

entfernt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse und
5 weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt
10 mindestens 90 % zu einer der Polypeptidsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 60 Aminosäuren besonders bevorzugt mindestens 90 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge eines
15 der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver-
20 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

25 Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von
30 mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

35 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu einer der Nukleinsäuresequenzen mit der SEQ ID NO: 1, 3,
40 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 haben. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 100 Basen, bevorzugt mindestens 200 Basen besonders bevorzugt mindestens 300 Basen, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35.

45

11

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die jeweilige Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0,

- 5 University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

10

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz

- 15 SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.
- 20 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vor-
- 25 genannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Saacharoseisomerase aufweisen.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungs-

- 30 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989),
- 35 6.3.1-6.3.6.) beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von

- 40 solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben
- 45 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.

12

Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung 5 und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- 10 a) 4X SSC bei 65°C,
b) 6X SSC bei 45°C,
c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
f) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C,
15 h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

(2) Waschschriffe können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- 20 a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
b) 0,1X SSC bei 65°C.
c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
25 d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäuresesequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharoseisomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodierend, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- 35 a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36, und
b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von mindestens 40 % zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36 aufweisen, und
40 c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35, und

13

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresesequenz von c) degeneriert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40 % zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren,

sowie funktionell äquivalenten Fragmenten der vorgenannten.

Funktionell äquivalente Fragmente meint in Bezug auf ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität bzw. eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine solche, all solche Polypeptide bzw. für diese kodierenden Nukleinsäuresesequenz, die gegenüber ihrer Ausgangssequenz eine Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende und/oder eine oder mehrere Deletionen aufweisen, aber nach wie vor über eine Saccharoseisomerase-Aktivität verfügen, bzw. für ein Protein mit derselben kodieren. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletion vom 5'- oder vom 3'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz die Synthese entsprechend verkürzter Proteine erreicht werden kann.

Wie oben erwähnt, können die kodierenden Sequenzen für Saccharoseisomerasen auch durch Signalsequenzen ergänzt sein, die für den Transport des Genprodukts, also vorliegend des Proteins mit Saccharoseisomerase-Aktivität, zu einem bestimmten Kompartiment sorgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sorgen Signalsequenzen dafür, dass die Saccharoseisomerase in die Zellwand bzw. den Apoplasten der transformierten Pflanzenzellen transportiert wird, d.h. die transformierten Pflanzen exprimieren eine chimäre Saccharoseisomerase, die ein Signalpeptid für den Transport in das Endoplasmatische Retikulum umfasst. Geeignete Signalsequenzen, die die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum gewährleisten, kann der Fachmann der einschlägigen Literatur entnehmen. Besonders geeignet ist z.B. die für das Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus Kartoffel kodierende Sequenz (Keil et al. (1996) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Accession No. X04118). Andere geeignete Signalsequenzen sorgen z.B. für die Aufnahme der Saccharoseisomerase in die Vakuole. Hier ist als Beispiel das Signalpeptid des Patatin-Gens

aus Kartoffel (Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1(1):95-106) zu nennen.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von
5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung der Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel
10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten
15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine
20 erhöhte Resistenz gegen ein oder mehrere Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die
25 Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens
30 90 % oder 95 % vermindert.

"Auswahl" umfasst in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Ver-
35 fahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die
40 Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Pilze, pilzähnliche Pathogene (wie beispielsweise Chromista; z.B. Oomyceten) sowie tierische Schädlinge wie
45 beispielsweise Nematoden. Besonders bevorzugt sind Nematoden und Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Expression eines

15

Saccharoseisomerase-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende
5 Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene:

Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista)
10 umfassen biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze und stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1
15 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

20	Erkrankung	Pathogen
	Braunrost	Puccinia recondita
	Gelbrost	P. striiformis
	Echter Mehltau	Erysiphe graminis
25	Spelzenbräune	Septoria nodorum
	Blattdürre	Septoria tritici
	Ährenfusariosen	Fusarium spp.
	Halmbruchkrankheit	Pseudocercospora herpotrichoides
30	Flugbrand	Ustilago spp.
	Weizensteinbrand	Tilletia caries
	Schwarzbeinigkeit	Gaeumannomyces graminis
35	Anthracnose leaf blight	Colletotrichum graminicola (teleomorph: Glomerella graminicola)
	Anthracnose stalk rot	Politis); Glomerella tucumanensis (anamorph: Glomerella falcata Went)
	Aspergillus ear and kernel rot	Aspergillus flavus
40	Banded leaf and sheath spot ("Wurzel töter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris)
	Black bundle disease	Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda
45	Black kernel rot	Lasioidiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
	Borde blanco	Marasmiellus sp.

	Erkrankung	Pathogen
	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
5	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
10	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Cochliobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (teleomorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuberculata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
15	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
20	Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
25	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodia leaf macrospora

Tabelle 2: Falscher Mehltau (Oomyceten)

	Erkrankung	Pathogen
30	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zeae
	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
35	Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
	Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
40	Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
	Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
45	Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari

	Erkrankung	Pathogen
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)
5	Ear rots, minor	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = 10 Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydis, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, 15 Scopulariopsis brumptii
	Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
	Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
20	Fusarium ear and stalk rot	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
25	Fusarium stalk rot, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
	Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
30	Gray ear rot	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
35	Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
	Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
	Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
40	Late wilt	Cephalosporium maydis

	Erkrankung	Pathogen
5	Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victorinae = Helminthosporium victorinae (teleomorph: Cochliobolus victorinae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
10		
15		
20	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
20	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
25	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
25	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystosporella zeae
	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
30	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenochaeta stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
35	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
40	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae

	Erkrankung	Pathogen
5	Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
10	Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = Helminthosporium rostratum)
15	Rust, common corn	Puccinia sorghi
	Rust, southern corn	Puccinia polysora
	Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zeae = Angiopsora zeae
20	Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
25	Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
30	Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
	Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
	Shuck rot	Myrothecium gramineum
35	Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
	Smut, common	Ustilago zeae = U. maydis
	Smut, false	Ustilaginoidea virens
	Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
40	Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
	Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinatum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
15	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gräsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschiimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

21

- mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia*
 5 *inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an
 15 Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini*
 20 (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste,
 25 Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).
- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum*
 30 (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halnbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rhynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-
 35 Rübe), *Cercospora beticola* (*Cercospora*-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarz-
 40 beinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und
 45 Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (*Fusarium*-Welke an Tomate), *Blumeria graminis* (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. *hordei*) und Weizen (f.sp. *tritici*)), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Septoria nodorum* und
5 *Septoria tritici* (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Tierische Schädlinge

Bei den im Rahmen dieser Erfindung als zur Bekämpfung bevorzugten pflanzenschädigenden Nematoden sind folgende Gruppen beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - zu nennen:

15

- a) Freilebende, wandernde Wurzel-nematoden: (z.B. *Pratylenchus*, *Xiphinema* und *Longidorus*-Arten).

Wandernden Nematoden sind nicht an eine Parasitierungsstelle ge-

- 20 bunden, sondern können diese wechseln. Sie können von einer Wurzel zur anderen, von einer Pflanze zur anderen und zum Teil auch im Pflanzengewebe wandern. Lange Zeit hat man ihre Bedeutung als Schädlinge unterschätzt: Heute zählen sie zu den überaus gefährlichen pflanzenschädigenden Nematoden. Viele Wachstumsschäden
25 (auch sog. "Bodenmüdigkeit") und frühzeitiges Vergilben der Kulturpflanzen konnten auf derartige Wurzelschädlinge zurückgeführt werden. Vor allem *Pratylenchus* Arten sind auch im Zierpflanzenbau als Ursache heftiger Wurzelschäden bekannt. Erkrankte Wurzeln sind daran zu erkennen, dass sie stellenweise braune Verfärbungen
30 aufweisen. In die hervorgerufenen Wunden dringen nachträglich auch Fäulnisorganismen ein, die ein rasches Absterben des Gewebes und tiefgehende Fäulnis an diesen Stellen zur Folge haben. Wirtspflanzen sind unter anderen: div. Getreidearten, Erdäpfel, Karotten, Paradeiser, Gurken, Sellerie und Wein.

35

- b) Wurzelgallenerzeugende Nematoden (z.B. *Meloidogyne*-Arten)

- Die Larven dieser Arten bohren sich meist nahe der Spitze in die Wurzeln ein und verursachen durch Ausscheidungen ihrer Speicheldrüsen Verdickungen (Gallen) des sie umgebenden Pflanzengewebes.
40 In diesen Gallen überdauern sie und gelangen entweder aktiv oder nach Zerfall der Gallen wieder in den Boden zurück. Die Störung im Stoffwechsel der Pflanze infolge des Schädlingsbefalls macht sich in mehr oder weniger kümmerlichem Wuchs und allgemeinem
45 Kränkeln der Pflanze bemerkbar. Wurzelgallenälchen zählen vor allem in Gewächshäusern zu den größten Schädlingen, wurden aber

auch im Freiland an Karotten, Sellerie und Petersilie nachgewiesen.

c) Nematoden als Schädlinge der Blütenanlagen: (*Anguina tritici*)

5

Das Weizenälchen ist ein spezialisierter Parasit der Blütenanlage des Weizens, die sie in Gallen umwandelt. Bereits im Jungstadium der Pflanze ist der Nematodenbefall an den Wellungen oder Kräuselungen der Blätter zu erkennen.

10

d) Zystenbildende Wurzel nematoden: (Globodera- und Heterodera-Arten)

Das Kartoffelzystenälchen ist der Kartoffelfeind Nummer 1. Diese Art übertrifft hinsichtlich ihrer Schädlichkeit alle anderen Heterodera-Arten und kann bei massiven Ausbruch bis zu 80% der Ernte vernichten. Nach dem Befall mit zystenbildenden Nematoden kümmert die Pflanze ohne äußerlich erkennbare Ursache. Erst wenn man die Wurzeln untersucht, erkennt man stecknadelkopfgroße, bräunlich, gelbe oder weißliche Zysten. Die weiblichen Nematoden bohren sich in die Wurzel und sprengen durch ihren mit Eiern gefüllten und dadurch anschwellenden Hinterleib die Wurzel. Der Nematode steckt mit seinem Mundstachel noch in der Wurzel, während der prall gefüllte Hinterleib im Erdreich liegt. Das Muttertier stirbt und seine sich verfestigende Haut wird zur Schutzhülle (Zyste) für die Eier und Larven. Die Zysten samt Inhalt sind sehr widerstandsfähig und können lange Zeit überdauern. Bei geeigneten Umweltbedingungen bohren sich die Larven ins Freie und befallen neue Wurzeln. Die wichtigsten zystenbildenden Nematoden sind Kartoffel-, Rüben-, Hafer-, Erbsen-, Klee-, Kohl-, Hopfen-, Möhrenzystenälchen (Untersuchung auf Kartoffelzystennematoden siehe auch unter: <http://www.bfl.at/>)

Als tierische Schädlinge sind insbesondere Nematoden bevorzugt. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 3: Parasitäre Nematoden

40

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

45

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chaltoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
10	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
20	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

- 25 Ganz besonders bevorzugt sind Globodera rostochiensis und G. pallida (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), Heterodera schachtii (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), Heterodera avenae (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), Ditylenchus dipsaci (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), Anguina tritici (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), Meloidogyne hapla (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).
- 30
- 35

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Pilzpathogene erzielt:

- 40 1. Gerste: Puccinia graminis f.sp. hordei (barley stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. hordei (Barley Powdery Mildew).
2. Sojabohne: Phytophthora megasperma fsp.glycinea, Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium oxysporum, Diaporthe phaseolorum var. sojae (Phomopsis sojae), Diaporthe phaseolorum var. caulivora, Sclerotium
- 45

25

- rolfsii, Cercospora kikuchii, Cercospora sojae, Peronospora manshurica, Colletotrichum dematium (Colletotrichum truncatum), Corynespora cassiicola, Septoria glycines, Phyllosticta sojicola, Alternaria alternata, Microsphaera diffusa,
- 5 Fusarium semitectum, Phialophora gregata, Glomerella glycines, Phakopsora pachyrhizi, Pythium aphanidermatum, Pythium ultimum, Pythium debaryanum, Fusarium solani.
3. Canola: Albugo candida, Alternaria brassicae, Leptosphaeria maculans, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum,
- 10 Mycosphaerella brassicicola, Pythium ultimum, Peronospora parasitica, Fusarium roseum, Alternaria alternata.
4. Alfalfa: Clavibacter michiganense subsp. insidiosum, Pythium ultimum, Pythium irregulare, Pythium splendens, Pythium debaryanum, Pythium aphanidermatum, Phytophthora megasperma, Peronospora trifoliorum, Phoma medicaginis var. medicaginis, Cercospora medicaginis, Pseudopeziza medicaginis, Leptotrichia medicaginis, Fusarium, Aphanomyces euteiches, Stemphylium herbarum, Stemphylium alfalfae.
- 20
5. Weizen: Urocystis agropyri, Alternaria alternata, Cladosporium herbarum, Fusarium graminearum, Fusarium avenaceum, Fusarium culmorum, Ustilago tritici, Ascochyta tritici,
- 25 Cephalosporium gramineum, Colletotrichum graminicola, Erysiphe graminis f.sp. tritici, Puccinia graminis f.sp. tritici, Puccinia recondita f.sp. tritici, Puccinia striiformis, Pyrenophora tritici-repentis, Septoria nodorum, Septoria tritici, Septoria avenae, Pseudocercospora herpotrichoides,
- 30 Rhizoctonia solani, Rhizoctonia cerealis, Gaeumannomyces graminis var. tritici, Pythium aphanidermatum, Pythium arrhenomanes, Pythium ultimum, Bipolaris sorokiniana, Claviceps purpurea, Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia indica, Rhizoctonia solani,
- 35 Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola, Pythium aphanidermatum, Puccinia graminis f.sp. tritici (Wheat stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici (Wheat Powdery Mildew)
- 40 6. Sonnenblume: Plasmophora halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria helianthi, Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alternaria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macrophomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae, Rhizopus arrhizus, Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi, Verticillium dahliae,
- 45

26

Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo tragopogonis.

7. Mais: Fusarium moniliforme var. subglutinans, Fusarium
 5 moniliforme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum),
 Stenocarpella maydi (Diplodia maydis), Pythium irregulare,
 Pythium debaryanum, Pythium graminicola, Pythium splendens,
 Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Aspergillus
 10 flavus, Bipolaris maydis 0, T (Cochliobolus heterostrophus),
 Helminthosporium carbonum I, II & III (Cochliobolus
 carbonum), Exserohilum turcicum I, II & III, Helmintho-
 sporium pedicellatum, Physoderma maydis, Phyllosticta maydis,
 Kabatiella maydis, Cercospora sorghi, Ustilago maydis,
 Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macrophomina phaseolina,
 15 Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae, Cladosporium
 herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inaequalis,
 Curvularia pallescens, Trichoderma viride, Claviceps sorghi,
 Cornstunt spiropasma, Diplodia macrospora, Sclerophthora
 macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora
 20 philippinesis, Peronosclerospora maydis, Peronosclerospora
 sacchari, Spacelotheca reiliana, Physopella zeae, Cephalo-
 sporium maydis, Caphalosporium acremonium.
8. Sorghum: Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola
 25 (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora
 sorghi, Ascochyta sorghina, Puccinia purpurea, Macrophomina
 phaseolina, Perconia circinata, Fusarium monilifonne, Alter-
 naria alternate, Bipolaris sorghicola, Helminthosporium
 sorghicola, Curvularia lunata, Phoma insidiosa, Ramulispora
 30 sorghi, Ramulispora sorghicola, Phyllachara sacchari,
 Sporisorium reilianum (Sphacelotheca reiliana), Sphacelotheca
 cruenta, Sporisorium sorghi, Claviceps sorghi, Rhizoctonia
 solani, Acremonium strictum, Sclerophthona macrospora,
 Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis,
 35 Sclerospora graminicola, Fusarium graminearum, Fusarium
 oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz
 gegen nachfolgende beispielhaft genannte Nematodenpathogene
 40 erzielt:

	Zucker- rübe	Zuckerrübenzystenälchen (Sugar beet cyst nematode)	Heterodera schachtii
45	Kartoffel	Columbia Wurzelgal- lenälchen (Columbia Root- knot Nematode)	Meloidogyne chitwoodi
		Golden Nematode	Globodera rostochiensis

27

	Nördliches Wurzelgal- lenälchen (Northern Root Knot Nema- tode)	Meloidogyne hapla
5	Potato Rot Nematode	Ditylenchus destructor
	Sojabohne Sojabohnezystenälchen (Soybean cyst nematode; SCN)	Heterodera glycines
	Mais Maiszystenälchen (Corn Cyst Nematode)	Heterodera zeae
10	Wurzelgallenälchen (Root-Knot Nematodes)	Meloidogyne species: Meloidogyne arenaria Meloidogyne graminicola Meloidogyne chitwoodi Meloidogyne hapla Meloidogyne incognita
15		Meloidogyne javanica

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährigen, monocotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus,

Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, 5 Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranth- 10 aceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanacea, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae, Umbelliferae.

15

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr 20 sowie alle Arten von Gräsern.

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, 25 wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- 30 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie 35 (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,
- 40 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

45

29

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise *Coffea arabica* oder *Coffea liberica* (Kaffeestrauch) und andere mehr,
- 5 - Solanaceae besonders die Gattung *Lycopersicon*, ganz besonders die Art *esculentum* (Tomate), die Gattung *Solanum*, ganz besonders die Art *tuberosum* (Kartoffel) und *melongena* (Aubergine), und die Gattung *Capsicum*, ganz besonders die Art *annuum* (Paprika) sowie Tabak und andere mehr,
- 10 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Theobroma cacao* (Kakaostrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Camellia sinensis* oder *Thea sinensis* (Teestrauch) und andere mehr,
- 15 - Umbelliferae, besonders die Gattung *Daucus* (ganz besonders die Art *carota* (Karotte)) und *Apium* (ganz besonders die Art *graveolens dulce* (Selderie)) und andere mehr,
- 20 sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- 25 Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose);
- 30 Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetales, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendronen und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das
- 35 Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.
- 40 Am meisten bevorzugt sind landwirtschaftliche Nutzpflanzen, die von Natur aus einen hohen Anteil an Saccharose aufweisen oder deren Wurzeln, Knollen oder Speicherwurzeln wirtschaftlich verwertet werden, wie z.B. Kartoffel, Rübe oder Zuckerrübe.
- 45 Ebenfalls bevorzugt sind Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja sowie Getreidearten wie Hafer,

Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais. Am meisten bevorzugt sind Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe und Zuckerrohr.

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen Expressionskonstrukte
- 5 zur Expression von Proteinen mit Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzen zum Einsatz. Derartige Expressionskassetten sind beispielsweise in WO 01/59136 und WO 01/59135 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.
- 10 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder eines funktionellen Äquivalentes desselben oder eines funktionell äquivalenten Teils der vorgenannten) bevorzugt in funktioneller Verknüpfung
- 15 mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine transgene Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben gewährleistet.
- 20 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regula-
- 25 tiven Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar
- 30 von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind.
- 35 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J
- 40 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing
- 45 Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden,

die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen, einer att-Sequenz für Rekombinasen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevor-

5 zugt kann das transgene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

10

Unter einem Expressionskonstrukt sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für das Proteins mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. kodiert durch SEQ ID NO: 2 oder ein funktionelles Äqui-

15 valent desselben oder ein funktionell äquivalentes Teil der vorgenannten) - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - so hinter einen endogenen pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die transgene Expression der besagten Nukleinsäuresequenz gewährleistet.

20

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass

25 die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe oder Organ, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In Bezug auf die zu transformierende Pflanze kann

30 der Promotor homolog oder heterolog sein. Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

35

"Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor

40 oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt.

40

Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986)

45 Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor

ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium*, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689; Bruce et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter-
einheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus *A. thaliana* (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) *Gene* 170:197-200).

b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Blätter, Stengel, Wurzeln oder Samen.

Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) *Plant Cell* 1(9):839-53; z.B. aus *Phaseolus vulgaris*; van der Geest et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32:579-588), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) *J Biol Chem* 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) *Mol Gen Genet* 225(3):459-467; Phillips et al. (1997) *EMBO J* 16:4489-4496), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) *L Planta* 199:515-519), des Saccharosebindeteins (WO 00/26388), der Hordein-Promotor (Brandt et al. (1985) *Carlsberg Res. Commun.* 50:333-345) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) *Mol Gen Genet* 225:121-128; Bäumlein H et al. (1992) *Plant J* 2(2):233-239; Fiedler U et al. (1995) *Biotechnology (NY)* 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus *Brassica* (WO 91/13980).

Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase), der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, der Promotor der Stärkesynthase oder anderer Stärke bildender/modifizierender Enzyme wie z.B. Promotoren von Genen die für Verzweigungsenzyme

- 5 kodieren (WO 92/14827, WO 92/11375). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.
- 10
- Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
- 15
- Besonders bevorzugt ist dabei der B33-Promotor des Klasse I Patatin-Gens aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29). Der Promotor des Klasse I Patatin-Gens ist in Knollen ca. 100 bis 1000 mal aktiver als in Blättern (Rocha-Sosa et al., vide supra). Weitere Gene mit knollenspezifischer oder zumindest in Knollen verstärkter Expression sind bekannt (z.B. der Promotor der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase-Gene; Müller et al. (1990) Mol Gen Genet 224:136-146).
- 20
- Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase; US 4,962,028) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol Biol 36:101-112).
- 25
- 30
- 35
- c) Chemisch induzierbare Promotoren
- Die transgenen Expressionskonstrukte können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J
- 40
- 45

2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

5

d) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Frucht-reifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der
10 Fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

15 e) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der
20 pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPK Promotor.

25 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes et al.
30 (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics
35 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

40 Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498; EP-A 375 091), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des
45 Systemin Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76),

des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

5 Besonders bevorzugt sind Promotoren, die speziell in Nährzellsystemen (Syncytien) nach Nematodenbefall induziert werden. Beispielfhaft seien zu nennen

- 10 i) der $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) Science 263: 221-223), insbesondere der durch SEQ ID NO: 24 beschriebene Promotor,
- 15 ii) der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449), insbesondere der durch SEQ ID NO: 23 beschriebene Promotor, sowie
- iii) Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832), insbesondere die durch SEQ ID NO: 32, 33 oder 34 beschriebenen Promotoren.

20 Weitere im Rahmen dieser Erfindung bevorzugte nematoden-induzierbare Promotoren sind in WO 98/22599 beschrieben. Insbesondere bevorzugt sind dabei die regulatorischen Bereiche (d.h. die dem ATG-Startkodon vorgelagerten Bereiche) der Sequenzen mit den GenBank Acc.-No.: A91914 (Basenpaare 1 bis 3480). Ferner bevorzugt
25 sind die in US 6,395,963 beschriebenen Promotorsequenzen, die in WO 03/033651 beschriebenen Promotorsequenzen, die in JP 2001508661-A beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Sequenz mit den GenBank Acc.-No.: BD056958), sowie die in WO 97/46692 beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Se-
30 quenz mit den GenBank Acc.-No.: A79355; Basenpaare 1 bis 2127, oder 1 bis 2160). Weitere nematoden-induzierbare Promotoren können von Genen abgeleitet werden, deren Induktion infolge eines Nematodenbefalls beschrieben ist. Beispielfhaft - jedoch nicht einschränkend - sind zu nennen: Der Pollenin Promotor (Karimi M
35 et al. (2002) J Nematol 34(2):75-79) sowie der Promotor einer putativen Rezeptor Serin/Threonin Proteinkinase (Custers JHHV et al. (2002) Mol Plant Pathol 3(4):239-249).

Besonders bevorzugt sind pathogen- oder stress-induzierbare,
40 sowie Samen-, Knolle-, Wurzel-, Blatt- und/oder Stengel-spezifische, wobei pathogen-induzierbare (insbesondere die oben spezifisch genannten nematoden-induzierbaren Promotoren) am meisten bevorzugt sind.

45 Ein weiterer - besonders bevorzugter - Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, in denen eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität in

funktioneller Verknüpfung mit einem stress-, pathogen-, oder verwundungs-induzierbaren Promotor steht. Stress-, pathogen oder verwundungs-induzierbare Promotoren meint allgemein all solche Promotoren, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden können. Abiotischer Stress meint dabei Stimuli wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Frost, Feuchte, Salz, UV-Licht usw. Biotischer Stress meint dabei den Befall durch ein Pathogen, wobei der Begriff "Pathogen" all die oben genannten Pathogene umfasst. Dabei hat der Stimulus bevorzugt eine Stärke, die zu einem Ertragsrückgang von mindestens 5 % im Vergleich zu durchschnittlichen Ertragswerten führt. Induzierbar meint dabei eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität um mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 100 %, besonders bevorzugt mindestens 500 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 %, am meisten bevorzugt mindestens 5000 % im Vergleich zu der Expressionsaktivität einer nicht-stimulierten Pflanze. Stress- oder pathogen-induzierbare Promotoren umfassen beispielhaft, jedoch nicht einschränkend den pathogen-induzierbaren Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), den hitzeinduzierbaren hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), den kälteinduzierbaren α -Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), den licht-induzierbaren PPK Promotor oder den verwundungs-induzierbaren pinII-Promoter (EP-A 0 375 091). Bevorzugt sind insbesondere pathogen-induzierbare Promotoren wie z.B. die Promotoren der PR-Proteine, SAR-Proteine, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968). Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1- und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen. Verwundungs-induzierbare Promotoren sind bei Befall durch Fraßpathogene vorteilhaft einzusetzen.

Der Durchschnittsfachmann kann darüber hinaus ohne weiteres zusätzliche Beispiele für Gene mit stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierten Expressionsmustern der Literatur entnehmen. Ferner ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, 5 mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien entsprechende regulatorische Nukleinsäurelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten 10 Schritt eine differentielle Expressionsbibliothek von beispielsweise pathogen-infizierten/befallenen und "normalem" Geweben angelegt. Anschließend werden mit Hilfe der so identifizierten pathogen-induzierten cDNAs Promotoren isoliert, die über pathogen-induzierbare regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann 15 stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierter Promotoren zur Verfügung.

Besonders bevorzugt sind gewebespezifische Promotoren, 20 insbesondere samenspezifische, knollenspezifische, fruchtspezifische und blattspezifische Promotoren sowie pathogen-induzierte Promotoren.

Ganz besonders bevorzugt sind pathogeninduzierte Promotoren, insbesondere Nematoden-induzierte Promotoren.

25 Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel E.coli Bakterien 30 ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den Expressionskonstrukten oder Expressionsvektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen 35 Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion eines Expressionskonstruktes haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum 40 Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die Expressionskonstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzen-spezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz 45 als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls

weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, 5 Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressions-
steuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch
genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische
Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren
erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasser-
10 stress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH (1991) J Biol Chem
266(26):17131- 17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989)
Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untrans-
15 latierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von
Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S
Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116,
Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist
gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei
20 der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde
gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente
Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft
für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem
Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids
25 Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebes-
pezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine
oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell ver-
30 knüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene
Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende
der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können
zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie
weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die trans-
35 gen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer
oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind
pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche,
40 die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus Agro-
bacterium tumefaciens umfassen. Beispiele für besonders geeignete
Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator
und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator.

45 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die
eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines
Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom

erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine Saccharoseisomerase kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden.

5

Ein transgenes Expressionskonstrukt und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- 15 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide z.B. Metabolismusinhibitoren (wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika (wie z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin) oder Herbizide (wie Gyphosat oder Phosphinotricin) verleihen.

20

Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylharnstoff- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (spt) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (nptII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticin (G418) verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (hpt) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (als), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

35

40

- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders

45

bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), Chloramphenicoltransferase, Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

10

c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft als ORI ("origin of DNA replication") seien genannt der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

15

d) Elemente, die für eine Agrobakterium-vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

20

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

25

Die Einführung eines erfindungsgemäßen Expressionskonstruktes in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskonstrukte enthalten sind. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Das transgene Expressionskonstrukt kann in den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle oder eine Rekombinase att-Sequenz eingeführt werden. Der entstandene transgene Expressionsvektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit den dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind

35

40

45

solche Vektoren, die eine stabile Integration des transgenen Expressionskonstruktes in das pflanzliche Genom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid et al. (1991) *Mol Gen Genet* 228:104-112; Guerche et al. (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhauser et al. (1987) *Theor Appl Genet* 75:30-36; Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73; Howell et al. (1980) *Science* 208:1265; Horsch et al. (1985) *Science* 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind bei-

spielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985). Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist das transgene Expressions-
5 konstrukt in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in
einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector)
oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur
Transformation verwendet, ist zumindest die rechte Begrenzung,
meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder
10 Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit dem einzuführenden
transgenen Expressionskonstrukt verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren
können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren.
15 Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen für die
Selektion transformierter Pflanzen (z.B. das nptII Gen, das eine
Resistenz gegen Kanamycin verleiht) und einen Linker oder Poly-
linker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungs-
sequenz. Außerhalb der T-DNA-Begrenzungssequenz enthalten sie
20 zudem noch einen Selektionsmarker, der eine Selektion trans-
formierter E.coli und/oder Agrobakteria ermöglicht (z.B. das
nptIII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht). Ent-
sprechende Vektoren können direkt in Agrobacterium transformiert
werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187).

25 Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium
sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese
ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle
erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur
30 Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Ver-
wendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist
intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In:
The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V.,
Alblasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287).
35 Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommer-
ziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech
Laboratories, Inc. USA).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organis-
40 mus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation
von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen werden keine besonderen
Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache
Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen
vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert
45 werden, so ist es vorteilhaft, wenn sich auf dem Plasmid ein
zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

43

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker

5 kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines ent-

10 sprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin

15 verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in

20 üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in

25 Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225. Vorzugsweise wird das Expressionskonstrukt in einen Vektor kloniert,

30 der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann

35 eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt

40 und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992)

45 Plant Cell Rep. 11:567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep.

14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

"Transgen" meint alle solche Konstruktionen und Verfahren,
5 in denen sich entweder

- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität, oder
- 10 b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder

c) (a) und (b)

15

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer
20 Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek.

25

30

35

40

45

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
5
2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*
10 *rhapontici* (N-terminales Fragment)
4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*
15 *rhapontici* (N-terminales Fragment)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Erwinia rhapontici*
- 20 6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Erwinia rhapontici*
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
25
8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
30
10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 35 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Serratia plymuthica*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Serratia plymuthica*
40
13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für Fusions-
protein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*
rhapontici (*palI*) und Signalpeptidesequenz des
Proteinase Inhibitor II Gens
45

14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici* (palI) und Signalpeptidesequenz des Proteinase Inhibitor II Gens
- 5
15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz (vollständige cDNA mit untranslatierter Region) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 10
16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 15
17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz (offenes Leseraster) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 20
18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 25
19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)
- 30
20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)
- 35
21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)
- 40
22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)
- 45
23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicum esculatum*)
24. SEQ ID NO: 24 Nukleinsäuresequenz kodierend für Δ 0.3TobRB7 Promotorsequenz (Region: -298 bis +76) aus *Nicotiana tabacum*

47

25. SEQ ID NO: 25 Oligonukleotidprimer FB83
5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3'
26. SEQ ID NO: 26 Oligonukleotidprimer FB84
5'-GTCGACGTCTTGCCAAAAACCTT-3'
27. SEQ ID NO: 27 Oligonukleotidprimer FB 97
5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3'
28. SEQ ID NO: 28 Oligonukleotidprimer Lem1
5'-atcGAATTCATAATTTAACCATCTAGAG-3'
29. SEQ ID NO: 29 Oligonukleotidprimer Lem2
5'-atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG-3'
30. SEQ ID NO: 30 Oligonukleotidprimer Tob1
5'-GGAATTCAGCTTATCTAAACAAAGTTTTAAATTC-3'
31. SEQ ID NO: 31 Oligonukleotidprimer Tob2
5'-GGGTACCAGTTCTCACTAGAAAAATGCCCC-3'
32. SEQ ID NO: 32 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Wheat Dwarf Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006849; Sequenz 1 aus WO 00/01832)
33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Maize Streak Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006850; Sequenz 2 aus WO 00/01832)
34. SEQ ID NO: 34 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Pepper huasteco Virus (GenBank
Acc.-No.: AX006851; Sequenz 3 aus WO 00/01832)
35. SEQ ID NO: 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Serratia plymuthica
36. SEQ ID NO: 36 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Serratia plymuthica

40

45

Abbildungen

1. Fig. 1: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
5 35S: 35S Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) Promotor
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
10 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
2. Fig 2: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pB33-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
B33: Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33
15 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
20 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
3. Fig. 3: Westernblot-Analyse von palI exprimierenden Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien. Pro Spur wurden 20 µg lösliches Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen, getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Filter wurden anschließend mit einem polyklonalen PalI Antikörper hybridisiert. Verglichen wurde die Expression in Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen (wt) mit der in den Kartoffellinien 5, 12, 26 und 33.
25
- 30 4. Fig. 4: HPLC-Analyse der löslichen Kohlenhydrate in Saccharoseisomerase exprimierenden Pflanzen.
A: Zuckerstandards.
B: Extrakt einer transgenen Knolle.
C: Extrakt einer Wildtypknolle.
35
5. Fig. 5: Gehalt an Palatinose, Saccharose, Glucose und Stärke in Wildtyp-Kartoffelknollen (wt) und Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien (3 bis 37), die das chimäre palI Gen in der Zellwand exprimieren. Die Werte des Wildtyps (wt; gestreifte Säulen) und der transgenen Kartoffelknollen (3 bis 37; schwarze Säulen) entsprechen den Mittelwerten von vier Messungen ± Standardabweichung. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine transgene jedoch palI nicht-exprimierende Linie (Control) analysiert.
40
45

6. Fig.6: Infektion von Kartoffelknollen mit *Alternaria solani*. Kartoffelscheiben von Wildtyp-Knollen und Knollen der *pall* exprimierenden transgene Linien 5 und 33 zum Zeitpunkt 14 Tage nach Infektion mit *Alternaria solani*.
- 5 A: Kontrolle mit Kartoffelscheiben von Wildtyp (wt)- und transgenen Knollen (Linien 5 und 33) nach 14-tägiger Inkubation ohne vorherige *Alternaria* Infektion.
- B: Wildtypknollen; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
- C: Transgene Linie-5; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
- 10 D: Transgene Linie-33; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
7. Fig. 7: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pLemmi9-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 Lemmi9: Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*)
- 15 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
pall: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
 OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
- 20
8. Fig 8: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pΔ0.3TobRB7-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 Δ0.3TobRB: Δ0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*
 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
- 25 *pall*: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
 OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

30 Beispiele

Allgemeine Methoden:

- Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise,
- 35 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte - wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren
- 40 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA - werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.
- 45 Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Hofgen und Willmitzer ((1988) Nucl. Acids Res. 16:9877) ausgeführt. Die Anzucht der *Agrobacterien* erfolgte

in YEB Medium (Vervliet et al. (1975) Gen Virol 26:33). Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: PCR-Amplifikation eines Subfragments der Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici*

- 10 Die Klonierung eines Subfragments der Saccharoseisomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische DNA aus *E. rhapontici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nach-
- 15 folgenden spezifischen Primer, die von einer Saccharoseisomerase-Sequenz des Standes der Technik abgeleitet wurden:

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB84 5'-GTCGACGTCTTGCCAAAAACCTT-3' (SEQ ID NO: 26)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB84 die Basen 1289 bis 1306 der kodierenden Region des Saccharoseisomerase-Gens von *E. rhapontici*.

25

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

- chromosomale Bakterien DNA (1 µg)
- Primer FB 83 und FB 84 (jeweils 250 ng),
- 30 - Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min

35 auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt

40 (Invitrogen) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert.

Das amplifizierte Subfragment kann auch als Hybridisierungs-sonde für die Isolierung weiterer Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen

45 aus anderen Organismen oder als Sonde bei der Analyse transgener Zellen und Pflanzen eingesetzt werden.

51

Beispiel 2: PCR-Amplifikation einer Saccharoseisomerase aus
Erwinia rhapontici

Unter Verwendung des in Beispiel 1 amplifizierten Fragmentes
5 wurde eine genomische Bank von *Erwinia rhapontici* nach Standard-
methoden durchmustert. Anschließend Sequenzanalysen erlaubten
die Bestimmung des offenen Leserahmens der Saccharoseisomerase.
Von dieser Sequenz wurden die Oligonukleotidprimer FB83 und FB97
abgeleitet.

10

Die Klonierung des vollständigen offenen Leserasters der
Saccharose-Isomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion
(Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente
genomische DNA aus *E. rhapontici* (DSM 4484), die nach Standard-
15 protokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Ver-
wendung der nachfolgenden spezifischen Primer

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB97 5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3' (SEQ ID NO: 27)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB97 die
Basen 1786 bis 1803 der kodierenden Region des Saccharose-
isomerase-Gens. Zur Klonierung der amplifizierten DNA in
25 Expressionsvektoren tragen die Primer zusätzlich folgende
Restriktionsschnittstellen: Primer FB 83, BamHI und Primer FB 97,
SalI.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomale Bakterien-DNA (1 µg),
- Primer FB83 und FB97 jeweils 250 ng,
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 35 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min
auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden
in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem
40 Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung
der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C
(2 Minuten). Das amplifizierte Saccharoseisomerase-Fragment
wurde in den Vektor pCR-Blunt (Invitrogen) kloniert, wodurch
das Plasmid pCR-SucIso2 (ohne Translationsstart) erhalten wurde.
45 Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse
verifiziert. Das PCR-Fragment beinhaltet somit die Sequenz einer

Saccharoseisomerase aus *E. rhapontici*, die sich von Nukleotid 109-1803 des Saccharoseisomerase-Gens erstreckt.

Beispiel 3: Herstellung von Plasmid p35S-cwIso

5

Eine DNA Sequenz, die für eine Saccharose-Isomerase kodiert, wurde aus dem Plasmid pCR-SucIso2 isoliert und mit dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzenzellen vermittelt sowie
10 einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens.

Vor die kodierende Sequenz des Saccharoseisomerase-Gens wurde
15 außerdem ein für die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Gens (Proteinase-Inhibitor II-Gen aus Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.-No.: X04118) fusioniert. Dazu wurde
20 das Saccharoseisomerase-Fragment aus dem Konstrukt pCR-SucIso2 über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI herausgeschnitten und in einen BamHI/SalI-geöffneten pMA-Vektor ligiert. Der Vektor pMA stellt eine modifizierte Form des Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) dar. Welche
25 tive Expression in transgenen Pflanzen vermittelt, ein Signalpeptid des Proteinase-Inhibitors II aus Kartoffel, welches die Zielsteuerung des Fusionsproteins in die Zellwand vermittelt, sowie ein pflanzliches Terminationssignal enthält. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungs-
30 stelle des Octopin-Synthase Gens. Zwischen der Teilsequenz des Proteinase-Inhibitors und dem Terminationssignal befinden sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, XbaI, SalI, PstI und SphI (in dieser Reihenfolge), welche die Insertion entsprechender DNA-Fragmente ermöglichen, so dass ein Fusion-
35 sprotein zwischen dem Proteinase-Inhibitor Signalpeptid und dem eingefügten Protein entsteht, welches dann in die Zellwand von transgenen Pflanzenzellen befördert wird, die dieses Protein exprimieren. Die Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso besteht somit aus den Fragmenten A, B und C (Fig. 1):

40

A) Fragment A beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt (Franck (1980) Cell 21:285).

45

- 5 B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines
Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al.,
supra), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA
TTG GG an das Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*,
welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind.
Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das Endo-
plasmatische Retikulum (ER) notwendige Signalpeptid eines
pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase
Sequenz fusioniert.
- 10 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-
Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J. 2:419-426. GenBank
Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).
- 15 In p35S-cwIso (35S = 35S-Promotor, cw = Zellwand, Iso =
Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharose-
isomerase aus *E. rhapontici* unter konstitutiver Kontrolle,
das Genprodukt wird in das ER aufgenommen und anschließend
sekretiert.
- 20 Beispiel 4: Herstellung von Plasmid pB33-cwIso
- Das Plasmid pB33-cwIso wurde unter Verwendung des binären
Plasmids p35S-cwIso hergestellt. Dabei wurde der 35S-Promoter
25 gegen den Promotor des Klasse I Patatin-Gens (Rocha-Sosa et al
(1989) EMBO J 8:23-29) ausgetauscht. Die Expressionskassette
dieses Plasmids pB33-cwIso besteht somit aus den drei Fragmenten
A, B und C (siehe Fig. 2):
- 30 A) Fragment A beinhaltet die Region -1512 bis +14 relativ
zur Transkriptionsinitiationsstelle des Klasse I Patatin-
Gens. Die Promotorregion wurde als DraI-Fragment in den
mit SstI geschnittenen Vektor pUC18, dessen Enden unter
Einsatz der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und somit geglättet
35 worden waren, ligiert. Anschließend wurde das Fragment
mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 aus dem
Vektor pUC18 wieder ausgeschnitten und in das Plasmid
p35S-cwIso kloniert, aus dem vorher der 35S CaMV-Promotor
nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und
40 Asp718 deletiert worden war.
- B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines
Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel, welche
über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das
45 Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die
Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind. Dadurch
wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges

Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

- C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426; GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

In pB33-cwIso (B33 = Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende
10 Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhapontici* unter gewebe-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

Beispiel 5: Kartoffeltransformation und Selektion transgener
15 Pflanzen

20 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara) wurden in 10 ml MS-Medium mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter
20 Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtkultur enthielt. Nach 5-minütigem, leichtem Schütteln wurden die Petri-schalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin
25 und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurde die Claforankonzentration im Medium halbiert. Eine weitere Woche Kultivierung erfolgte unter bekannten Bedingungen (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29).

30 Unter Verwendung des pB33-cwIso Plasmids wurden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation insgesamt 36 kanamycin-resistente Kartoffelpflanzen regeneriert. Die Knollen dieser Pflanzen wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das rekombinante PalI Protein (Börnke et al. (2002)
35 Planta 214:356-364) auf palI Expression untersucht. Bei 25 Linien konnte palI Expression im Westernblot nachgewiesen werden. Ein Westernblot von repräsentativen Linien ist in Fig. 3 dargestellt.

40 Beispiel 6: HPLC-Analyse der transgenen pB33-cwIso-Kartoffeln

Mit dem Ziel des Nachweises der in vivo Konversion von Saccharose in Palatinose wurden Knollenextrakte der transgenen Linien mittels HPLC hinsichtlich ihres Gehaltes an löslichen Kohlen-
45 hydraten untersucht. Die HPLC Analyse wurde nach der in Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Herstellung der Knollen Extrakte ist beschrieben

bei Sonnewald et al. (1992) Plant J 2:571-581. Die Resultate der HPLC Analyse sind in Fig. 4 dargestellt.

Wie die Chromatogramme zeigen, führt die Expression der
5 Saccharoseisomerase in der Zellwand zu einer substantiellen Akkumulation von Palatinose in den Knollen der untersuchten pB33-cwIso-Linien. Der Wildtyp enthält keine Palatinose, wie ebenfalls aus den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist. Der Gehalt an löslichen Zuckern in transgenen Kartoffel-
10 knollen, die das Konstrukt pB33-cwIso enthalten, ist in Fig. 5 dargestellt. Der Gehalt an Palatinose in den Kartoffelknollen variiert zwischen den einzelnen transgenen Linien zwischen 1,7 $\mu\text{mol/g}$ FW (FW: "fresh weight" = Frischgewicht) (Linie 14) und 16 $\mu\text{mol/g}$ FW (Linie 5).

15

Beispiel 7: Infektion von Karoffelscheiben mit *Alternaria solani*

Alternaria solani (bereitgestellt von Dr. Jürgen Sigrist, Zentrum für Grüne Gentechnik, Neustadt an der Weinstraße) wurden auf
20 PDA-Agar (Duchefa, Niederlande) für 14 Tage bei 16°C gehalten (PDA = Potato Dextrose Agar). Die Sporen wurden durch Abschaben in Wasser isoliert und die erhaltene Suspension durch Miracloth von festen Bestandteilen befreit. Die Sporenzahl wurde in einer Zählkammer (Thoma) bestimmt und auf 10000 Sporen/ml eingestellt.
25 25 μl (demnach 250 Sporen) wurden pro Kartoffelscheibe (1,5 cm Durchmesser) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die inokulierten Scheiben wurden anschließend bei 16°C inkubiert. Die Bonitur erfolgte optisch. Das Ergebnis nach 14-tägiger Inkubation ist in Fig. 6 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ist
30 das Wachstum des Pilzes auf transgenen Kartoffelknollen, die die Saccharoseisomerase exprimieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso

35

Zur Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Lemmi9 Promotor Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:440-449) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-
40 Inhibitor II-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter die Kontrolle des "Feeding cell"-spezifischen Promotor gestellt.

Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Lemmi9-Promotors wurde bereits demonstriert (Escobar C et al. (1999)
45 Mol Plant Microbe Interact 12:440-449). Das Plasmid pLemmi9-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (siehe Fig. 7):

- A) Fragment A beinhaltet den Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Das Fragment beinhaltet die Sequenz von 1417 bp vor dem Translationsstart (ATG) des Lemmi9-Gens und wurde als funktionelles Promoterfragment charakterisiert (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449, Accession Z69032). Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:
- Lem1: 5'atcGAATTCATAATTTAACCATCTAGAG 3' (SEQ ID NO: 28)
- Lem2: 5'atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG 3' (SEQ ID NO: 29)
- Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Lem1, EcoRI; Primer Lem2, Asp718.
- Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:
- genomische Tomaten-DNA (1 µg),
 - Primer Lem1 und Lem2 (jeweils 250 ng),
 - Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
 - 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).
- Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.
- B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die

Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch ist ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5

- C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

- 10 In pLemmi9-cwIso (Lemmi9 = Promotor des Lemmi9-Gens aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter Feeding cell-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15

Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Lemmi9-Promotors hergestellt (pLemmi9-GUS).

- 20 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pLemmi9-cwIso bzw. pLemmi9-GUS transformiert und ganze Kartoffelpflanzen wurden regeneriert.

- 25 Beispiel 9: Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso

Zur Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Δ 0.3TobRB7 Promotor (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223)

- 30 ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter Feeding cell-spezifische Kontrolle gestellt.

- Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Δ 0.3TobRB7-Promotors wurde bereits demonstriert (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223). Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase-Gens. Das Plasmid p Δ 0.3TobRB7-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (Fig. 8):

40

- A) Fragment A beinhaltet den Δ 0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*. Das Fragment beinhaltet die Region von -298 bp bis +76 des TobRB7-Gens befinden und als funktionelles Promotorfragment charakterisiert wurden (Opperman et al. (1994) Science. 263: 221-223, Acc.-No.: S45406) . Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN

45

amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

Tob1: 5'-GGAATTCAGCTTATCTAAACAAAGTTTTAAATTC-3' (SEQ ID NO: 30)

Tob2: 5'-GGGTACCAGTTCTCACTAGAAAAATGCCCC-3' (SEQ ID NO: 31)

Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Tob1, EcoRI; Primer Tob2, Asp718.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

- genomische DNA aus Tabak (1 µg),
- Primer Tob1 und Tob2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

- B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapsodici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

- 5 In p Δ 0.3TobRB7-cwIso (Δ 0.3TobRB7 = verkürzter Promotor des TobRB7-Gens aus Tabak, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter "Feeding cell"-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

10

Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Δ 0.3TobRB7-Promotors hergestellt (p Δ 0.3TobRB7-GUS).

- 15 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt p Δ 0.3TobRB7-cwIso bzw. p Δ 0.3TobRB7-GUS transformiert und Kartoffelpflanzen wurden regeneriert

20 Beispiel 10: Infektion der Pflanzen mit Nematoden

Transformierte Pflanzen werden mit Hilfe von npt-spezifischen Primern über PCR bestätigt. Zur Infektion mit Nematoden werden die Stecklinge von transgenen Linien, die die Saccharoseisomerase

- 25 unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zuerst auf Medium mit Kanamycin angezogen und später in Töpfe mit steriler Erde transferiert. Die Pflanzen werden bei 22°C (16 h Tag/8 h Nacht) angezogen. Die Infektion der Pflanzen wird wie folgt durchgeführt: 3 ml einer Suspension
30 (ca. 500 J2-Larven) von Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) werden direkt neben den Stengeln der Pflanzen in die Erde inokuliert. Die Pflanzen werden nach 2 bis 3 Wochen aus den Töpfen entfernt und die Wurzeln gewaschen. Anschließend wird
35 die gesamte Wurzel einer jeden Pflanze mit Hilfe eines Stereomikroskopes untersucht und die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem von transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen verglichen.

- Transgene Pflanzen, die die Saccharoseisomerase unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zeigen
40 eine deutliche Resistenz gegenüber endoparasitären Wurzel-nematoden. Die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem dieser Pflanzen nach Nematodenbefall ist im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen signifikant reduziert.

45 Beispiel 11: In vitro Nematodenresistenz-Test

Materialien:

Pflanzen: Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara)

Nematoden: *Meloidogyne incognita*

- 5 Medium: modifiziertes Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt mit Agar) bestehend aus micro und 1/2 macro-Elementen einschließlich Vitaminen, Sucrose und Diachin-Agar (0,7%) pH 5,8.

- 10 Pflanzen: Sterile transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara transformiert mit p Δ 0.3TobRB7-cwIso bzw. pLemmi9-cwIso) und entsprechende transgene Kontrollpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara transformiert mit p Δ 0.3TobRB7-GUS bzw. pLemmi9-GUS) wurden in Gläsern mit jeweils mehreren Pflanzen
15 bereitgestellt. Ausgehend von jeder Pflanze wurden jeweils drei Linien mittels Stengelabschnitten und nachfolgender Kultivierung auf modifiziertem Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt mit Agar) generiert. Jede Linie wurde auf einer separaten 9 cm Petri-
schale ausgepflanzt. Die Pflanzen wurden für 2 bis 3 Wochen unter
20 einem Licht/Dunkel-Regim von 16h Licht / 8h Dunkelheit bei 25°C gezüchtet.

Nematoden-Stammkultur:

- Nematoden wurden aus sterilen Stammkulturen gewonnen. *M. incognita* wurde monoxenisch in der Dunkelheit bei 25°C auf Wurzelex-
25 plantaten von *Cucumis sativus* gezüchtet, wie bei Wyss et al. beschrieben (Wyss U et al. (1992) *Nematologica* 38:98-111). Eier-
säcke wurden aus den Sterilkulturen gesammelt und auf einem Sieb in einem Glastrichter mit sterilem Wasser plaziert. Die Trichter
30 wurden mit einem Platikschlauch verbunden, welcher mit einer Klemme verschlossen wurde. Geschlüpfte Jungtiere wurden durch Öffnen der Klemme und Ablassen der Suspension in kleine Gefäße gewonnen. Die Viskosität der Suspension wurde durch Zufügen einer
Suspension von sterilem "Gel Rite" erhöht. Die Dichte der Nematoden in der Suspension wurde bestimmt und durch Zugabe von steri-
35 lem Wasser normiert.

Nematodeninfektion

- Sobald die Pflanzenwurzeln ein Wurzelsystem entwickelt hatten,
40 wurden die Wurzeln mit frisch geschlüpfen Jungnematoden im zweiten Stadium (J2) infiziert. Zehn Tropfen mit jeweils 10 Jungtieren wurden dabei auf jede Pflanze appliziert.

Auswertung:

- 45 Nach 2 bis 3 Wochen hatten die Nematoden die Wurzeln penetriert und in den Kontrollpflanzen hatten sich Gallen gebildet. Gallenbildung wurde als Zeichen einer erfolgreichen Penetration und

61

Etablierung von Freßstellen in den Wurzeln herangezogen. Die Wurzeln der verschiedenen Pflanzenlinien wurden auf Gallen mikroskopisch untersucht und die Gallen auf der Petrischale vermerkt.

- 5 Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigen die mit p Δ 0.3TobRB7-cwIso bzw. pLemmi9-cwIso transformierten Kartoffellinien eine signifikante Verringerung der Gallenbildung. Dies bedeutet eine signifikante Minderung der Nematoden-bedingten Schädigung.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
5 mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei
nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder
10 einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
 - b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen
- im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus -
die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht
15 oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase
beschrieben wird durch
 - i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
20 oder 36, oder
 - ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
25
 - iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein
gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die
30 Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch
eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine
Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz
35 gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
oder 36, und
 - b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer
Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß
40 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 26
aufweisen, und
 - c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
13, 15, 17, 19, 21 oder 35, und
45

63

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresesequenz von c) degeneriert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promotors exprimiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder epidermis-spezifischen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare oder epidermis-spezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.

11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

25

30

35

40

45

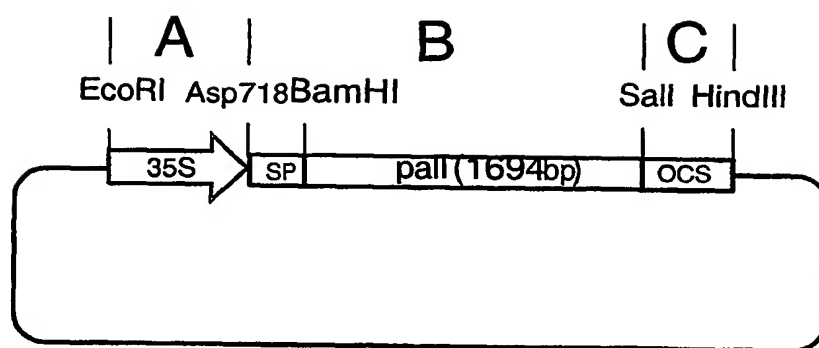


Fig.1

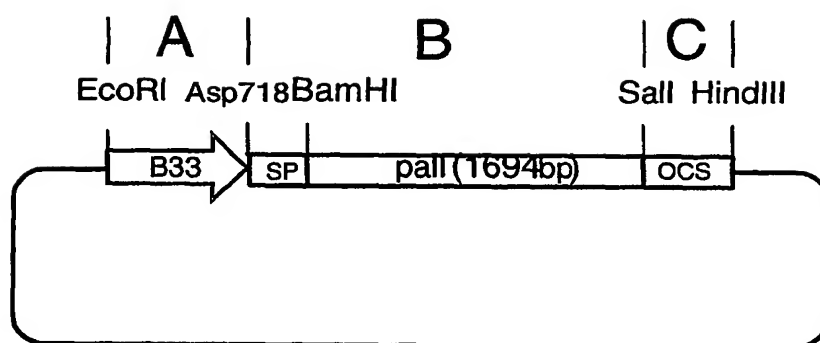


Fig.2

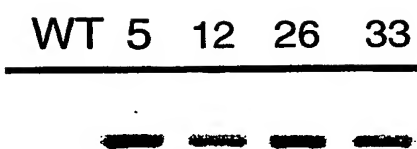


Fig.3

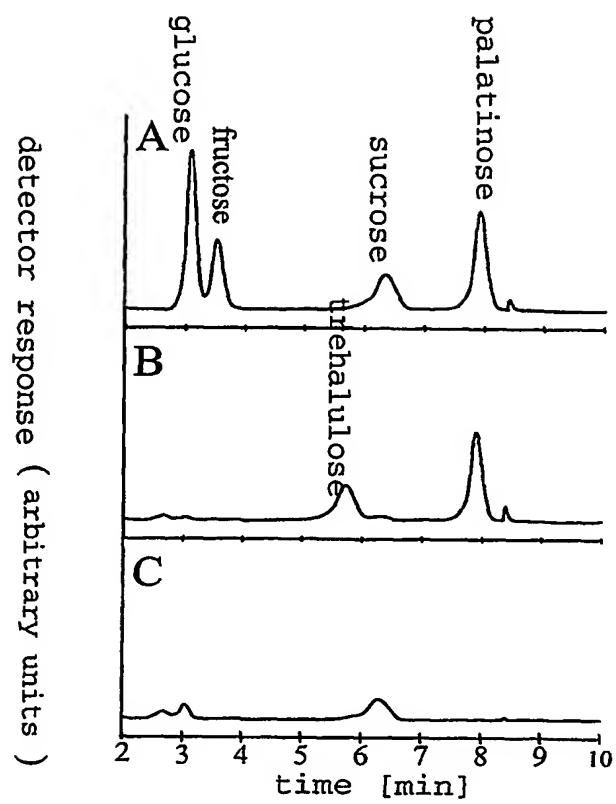


Fig. 4

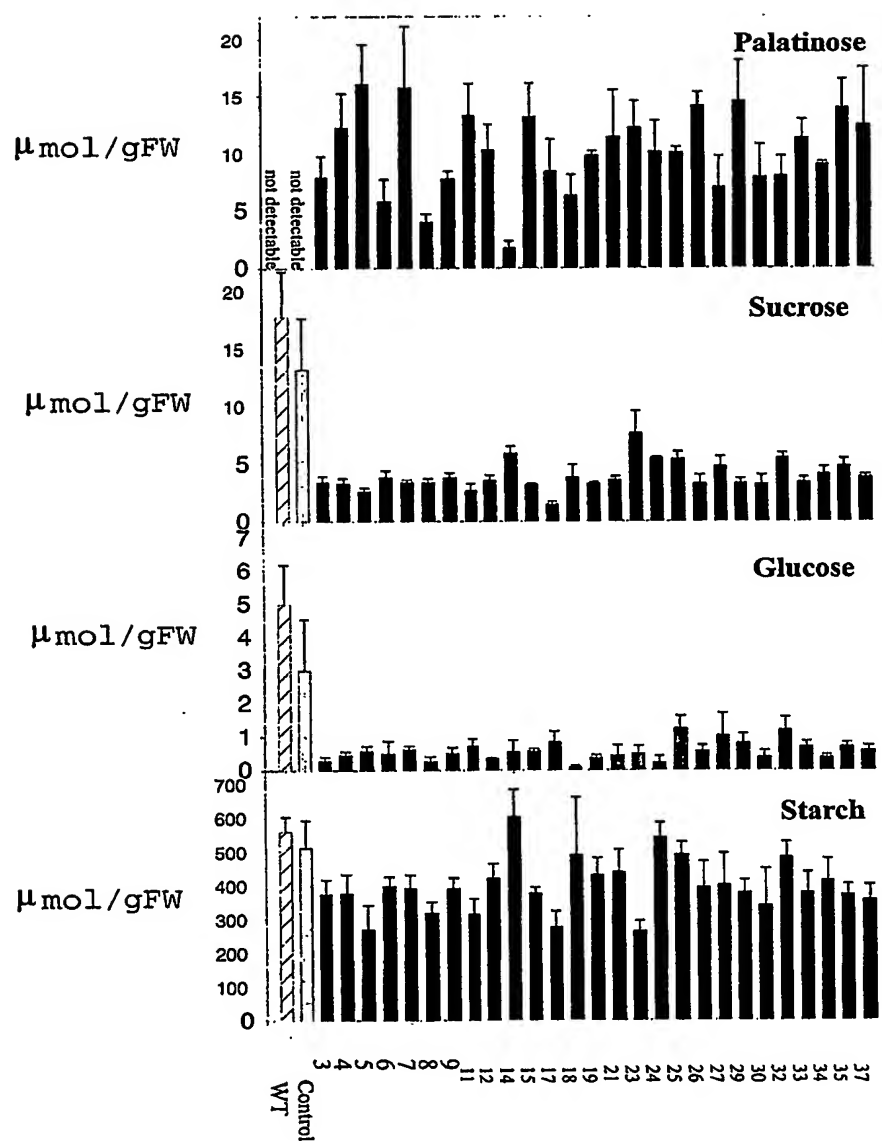


Fig. 5

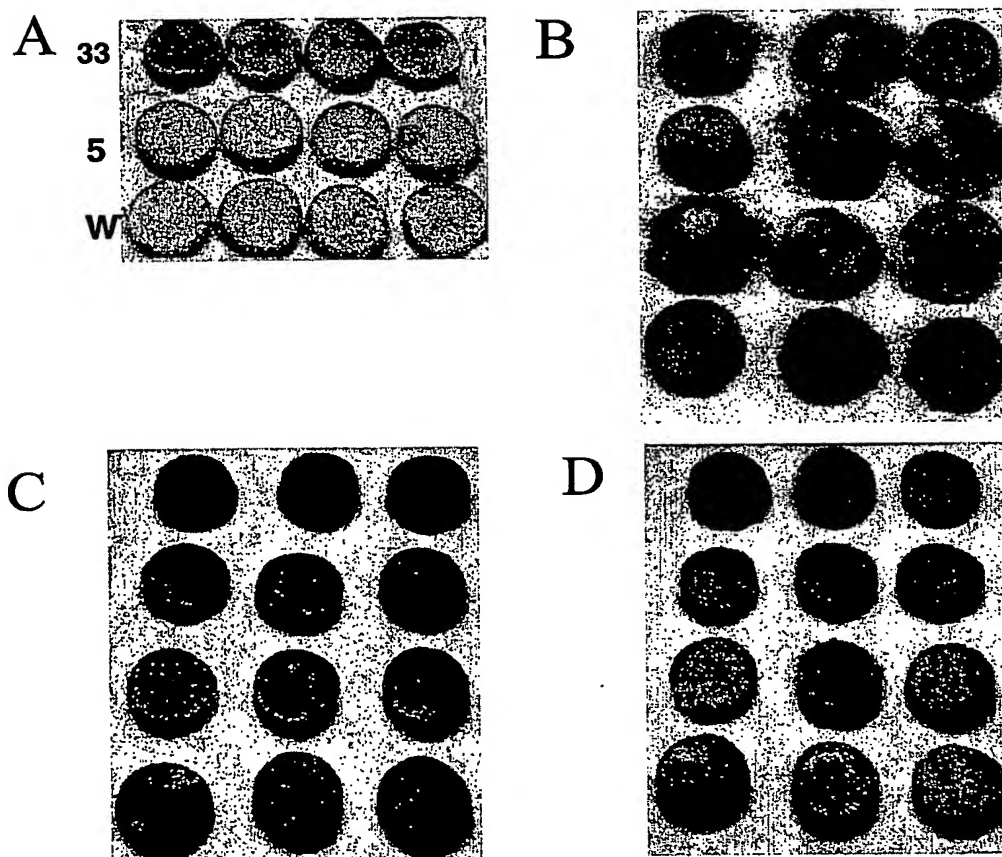
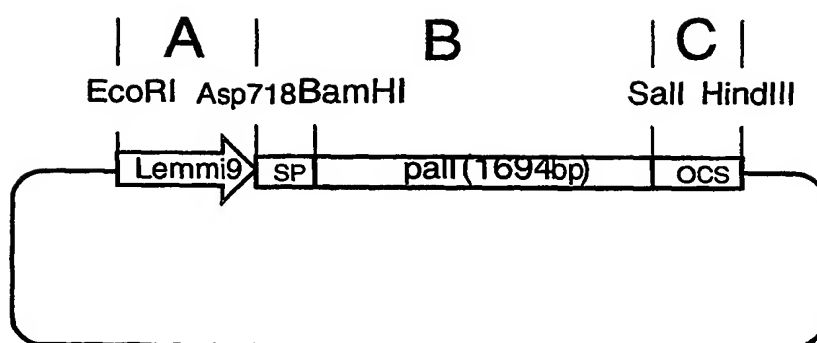
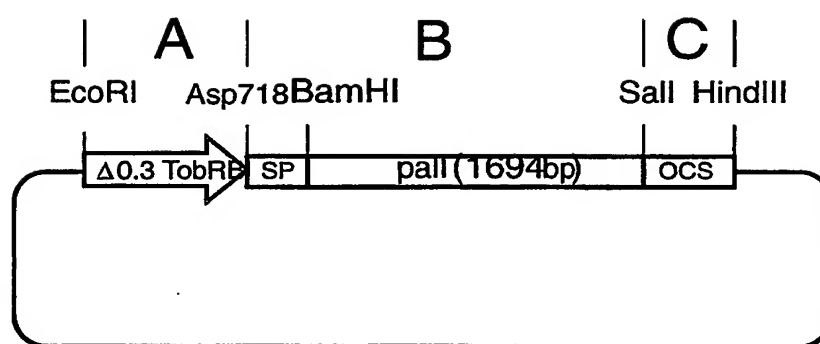


Fig. 6

**Fig.7**

**Fig.8**

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KGaA

<120> Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

<130> PF53687

<140>

<141>

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1890

<212> DNA

<213> Protaminobacter rubrum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1887)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 1

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca	48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1 5 10 15	
tca tta tgc atc tca tgc cag caa gcc ttc ggt acg caa caa ccc ttg	96
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20 25 30	
ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
aag gag gct gtt ttt tat cag gtg tat ccg cgc tcc ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac gga gat ggc atc ggg gat att aac ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat cta aaa gcc ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tct ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgg aat atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgc ggc tat tat ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	

cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aat ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg tta cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgt ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gat ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gcg gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aaa gag gtc ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcg act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	
ata aag ttc ttc gat cgc cgc cgt gat gag ctg aac att gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gat tgg aaa ttg tcg caa ttc cgg cag atc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gca gga gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcg cac ttt ggc gat gat gat cgc cca caa	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Asp Arg Pro Gln	
370 375 380	
tgg cgt gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa	1200
Trp Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln	
385 390 395 400	
cga gca aca cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat	1248
Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn	
405 410 415	
tac ccg ttt aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt	1296
Tyr Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly	
420 425 430	
ttt tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtc aaa gcc gac gag ttc	1344
Phe Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe	
435 440 445	

ttg caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg acg ccg ttc 1392
 Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe
 450 455 460

caa tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg 1440
 Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp
 465 470 475 480

ttc aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc 1488
 Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val
 485 490 495

aca caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata 1536
 Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile
 500 505 510

agg cat gac atc ccg gca ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat 1584
 Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp
 515 520 525

cct gca aat gat tgc gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa 1632
 Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu
 530 535 540

aaa tat ctt gtt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa 1680
 Lys Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys
 545 550 555 560

tta ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc 1728
 Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser
 565 570 575

aaa aac gtg gtg aaa aag aat gat tca tta ctc gag cta aaa cca tgg 1776
 Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp
 580 585 590

cag tca ggg gtt tat aaa act aaa tca ata aat ctc ata gtc acg cca 1824
 Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro
 595 600 605

aat aat gta aat ata ttg aaa cta tta aaa ccg gca ttt tat gcc ggt 1872
 Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly
 610 615 620

ttt ttt agc gca aaa tag 1890
 Phe Phe Ser Ala Lys
 625

<210> 2
 <211> 629
 <212> PRT
 <213> Protaminobacter rubrum

<400> 2
 Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
 1 5 10 15
 Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu
 20 25 30
 Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
 35 40 45
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
 100 105 110
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
 115 120 125
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140
 His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys
 145 150 155 160
 Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255
 Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
 260 265 270
 Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr
 275 280 285
 Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
 290 295 300
 Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
 325 330 335
 Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp
 340 345 350
 Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Asp Arg Pro Gln
 370 375 380
 Trp Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln
 385 390 395 400
 Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn
 405 410 415
 Tyr Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly
 420 425 430
 Phe Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe
 435 440 445
 Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe
 450 455 460

Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp
 465 470 475 480
 Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val
 485 490 495
 Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile
 500 505 510
 Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp
 515 520 525
 Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu
 530 535 540
 Lys Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys
 545 550 555 560
 Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser
 565 570 575
 Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp
 580 585 590
 Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro
 595 600 605
 Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly
 610 615 620
 Phe Phe Ser Ala Lys
 625

<210> 3

<211> 1305

<212> DNA

<213> *Erwinia rhapontici*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1305)

<223> coding for N-terminal fragment of sucrose isomerase

<400> 3

atg tcc tct caa gga ttg aaa acg gct ntc gct att ttt ctt gca acc	48
Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr	
1 5 10 15	
act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc nnn cca gat acc	96
Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr	
20 25 30	
gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg	144
Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp	
35 40 45	
aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg	192
Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp	
65 70 75 80	
tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac	288
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	

gat tcg ccg aat acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat cag cat gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag	480
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa	576
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag	624
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt	720
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acc gtt gcc acc tac tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser	
245 250 255	
caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys	
260 265 270	
att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat	864
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser	
290 295 300	
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gat ctg atc agg ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac	1056
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp	
340 345 350	
caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac	1104
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	

gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg 1152
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380

cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt 1200
 Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400

gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat 1248
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415

ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt 1296
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430

tgg caa gac 1305
 Trp Gln Asp
 435

<210> 4
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> *Erwinia rhapontici*
 <400> 4

Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr
 20 25 30

Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
 35 40 45

Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60

Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
 100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
 115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn
 130 135 140

His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys
 145 150 155 160

Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly
 165 170 175

His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu
 180 185 190

Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
 195 200 205

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
 210 215 220

Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
 225 230 235 240



<400> 5																
atg	tcc	tct	caa	gga	ttg	aaa	acg	gct	gtc	gct	att	ttt	ctt	gca	acc	48
Met	Ser	Ser	Gln	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Val	Ala	Ile	Phe	Leu	Ala	Thr	
1				5				10						15		
act	ttt	tct	gcc	aca	tcc	tat	cag	gcc	tgc	agt	gcc	ggg	cca	gat	acc	96
Thr	Phe	Ser	Ala	Thr	Ser	Tyr	Gln	Ala	Cys	Ser	Ala	Gly	Pro	Asp	Thr	
		20						25						30		
gcc	ccc	tca	ctc	acc	gtt	cag	caa	tca	aat	gcc	ctg	ccc	aca	tgg	tgg	144
Ala	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Gln	Gln	Ser	Asn	Ala	Leu	Pro	Thr	Trp	Trp	
		35				40						45				
aag	cag	gct	gtt	ttt	tat	cag	gta	tat	cca	cgc	tca	ttt	aaa	gat	acg	192
Lys	Gln	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	
50						55				60						
aat	ggg	gat	ggc	att	ggg	gat	tta	aac	ggg	att	att	gag	aat	tta	gac	240
Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Leu	Asn	Gly	Ile	Ile	Glu	Asn	Leu	Asp	
65				70						75				80		

tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac	288
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tcg ccg aat acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat cag cat gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag	480
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa	576
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag	624
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt	720
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acc gtt gcc acc tac tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser	
245 250 255	
caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys	
260 265 270	
att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat	864
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser	
290 295 300	
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gat ctg atc agg ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac	1056
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp	
340 345 350	

caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac	1104
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt	1200
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg caa gac tac gtt gaa aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aac gta cgc caa acc agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag	1392
Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat gca agc aaa aac gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta	1440
Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu	
465 470 475 480	
aaa atc aat ccc aat tat aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat	1488
Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn	
485 490 495	
aat cca aat tcc gta ttt aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc	1536
Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg	
500 505 510	
cat gac atc cct gcc ttg acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gac aac aat tca gtc tat gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa	1632
Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtg gtc att aat ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg	1680
Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu	
545 550 555 560	
ccc ggg gat tta tcc atc aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac	1728
Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His	
565 570 575	
act att gtg aat aaa aat gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag	1776
Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln	
580 585 590	
tcg ggc att tat aaa ctt aat ccg tag	1803
Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro	
595 600	

<210> 6

<211> 600

<212> PRT

<213> Erwinia rhapontici

<400> 6

```

Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1          5          10          15
Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr
          20          25          30
Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
          35          40          45
Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
          50          55          60
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
 65          70          75          80
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
          85          90          95
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
          100          105          110
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
          115          120          125
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn
 130          135          140
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys
 145          150          155          160
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly
          165          170          175
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu
          180          185          190
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
          195          200          205
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
 210          215          220
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
 225          230          235          240
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser
          245          250          255
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys
          260          265          270
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr
          275          280          285
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser
 290          295          300
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305          310          315          320
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg
          325          330          335
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp
          340          345          350
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
          355          360          365
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370          375          380

```

Arg	Glu	His	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg	
385					390					395					400	
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr	
				405					410					415		
Pro	Phe	Lys	Lys	Ile	Asp	Asp	Phe	Asp	Asp	Val	Glu	Val	Lys	Gly	Phe	
				420				425					430			
Trp	Gln	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	
		435					440					445				
Gln	Asn	Val	Arg	Gln	Thr	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln	
	450					455					460					
Trp	Asp	Ala	Ser	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Trp	Leu	
465					470					475					480	
Lys	Ile	Asn	Pro	Asn	Tyr	Lys	Glu	Ile	Asn	Ser	Ala	Asp	Gln	Ile	Asn	
				485					490					495		
Asn	Pro	Asn	Ser	Val	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	
				500				505					510			
His	Asp	Ile	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Ile	Asp	Leu	Asp	Pro	
		515					520					525				
Asp	Asn	Asn	Ser	Val	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Thr	Leu	Gly	Ala	Glu	Lys	
	530					535					540					
Tyr	Leu	Val	Val	Ile	Asn	Phe	Lys	Glu	Glu	Val	Met	His	Tyr	Thr	Leu	
545					550					555					560	
Pro	Gly	Asp	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Val	Ile	Thr	Glu	Asn	Asn	Ser	His	
				565					570					575		
Thr	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asp	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	Trp	Gln	
			580					585					590			
Ser	Gly	Ile	Tyr	Lys	Leu	Asn	Pro									
		595				600										

<210> 7

<211> 1803

<212> DNA

<213> Protaminobacter rubrum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1800)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 7

atg	ccc	cgt	caa	gga	ttg	aaa	act	gca	cta	gcg	att	ttt	cta	acc	aca	48
Met	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Leu	Ala	Ile	Phe	Leu	Thr	Thr	
1				5					10				15			
tca	tta	tgc	atc	tca	tgc	cag	caa	gcc	ttc	ggt	acg	caa	caa	ccc	ttg	96
Ser	Leu	Cys	Ile	Ser	Cys	Gln	Gln	Ala	Phe	Gly	Thr	Gln	Gln	Pro	Leu	
			20					25					30			
ctt	aac	gaa	aag	agt	atc	gaa	cag	tcg	aaa	acc	ata	cct	aaa	tgg	tgg	144
Leu	Asn	Glu	Lys	Ser	Ile	Glu	Gln	Ser	Lys	Thr	Ile	Pro	Lys	Trp	Trp	
			35				40					45				
aag	gag	gct	gtt	ttt	tat	cag	gtg	tat	ccg	cgc	tcc	ttt	aaa	gac	acc	192
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	
	50					55					60					

aac gga gat ggc atc ggg gat att aac ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat cta aaa gcc ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tct ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgg aat atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgc ggc tat tat ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aat ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg tta cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgt ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gat ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gcg gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aaa gag gtc ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcg act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	
ata aag ttc ttc gat cgc cgc cgt gat gag ctg aac att gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	

aaa gat tgg aaa ttg tcg caa ttc cgg cag atc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gca gga gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcg cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgt gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca aca cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccg ttt aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtc aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc ccg acg ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc aca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr	
485 490 495	
caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500 505 510	
cat gac atc ccg gca ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat cct	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa	1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa tta	1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu	
545 550 555 560	
ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc aaa	1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys	
565 570 575	
aac gtg gtg aaa aag aat gat tca tta ctc gag cta aaa cca tgg cag	1776
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln	
580 585 590	
tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa	1803
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln	
595 600	

<210> 8

<211> 600

<212> PRT

<213> Protaminobacter rubrum

<400> 8

```

Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
  1           5           10           15
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu
          20           25           30
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
          35           40           45
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
          50           55           60
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
          65           70           75           80
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
          85           90           95
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
          100          105          110
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
          115          120          125
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
          130          135          140
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys
          145          150          155          160
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
          165          170          175
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
          180          185          190
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
          195          200          205
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
          210          215          220
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
          225          230          235          240
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
          245          250          255
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
          260          265          270
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr
          275          280          285
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
          290          295          300
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
          305          310          315          320
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
          325          330          335
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp
          340          345          350

```

Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu
 435 440 445
 Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr
 485 490 495
 Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg
 500 505 510
 His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro
 515 520 525
 Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu
 545 550 555 560
 Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys
 565 570 575
 Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
 580 585 590
 Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
 595 600

<210> 9

<211> 1794

<212> DNA

<213> Enterobacter sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1791)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 9

atg	tct	ttt	gtt	acg	cta	cgt	acc	ggg	gtg	gct	gtc	gcg	ctg	tca	tct	48
Met	Ser	Phe	Val	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	
1				5				10					15			
ttg	ata	ata	agt	ctg	gcc	tgc	ccg	gct	gtc	agt	gct	gca	cca	tcc	ttg	96
Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Leu	
			20					25					30			
aat	cag	gat	att	cac	gtt	caa	aag	gaa	agt	gaa	tat	cct	gca	tgg	tgg	144
Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp	
			35				40						45			

aaa gaa gct gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aat gat gat ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac	240
Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat ctg aaa tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac	288
Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gac tct ccg aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln	
100 105 110	
ata atg aaa gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cat acc agt gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa	480
His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys	
145 150 155 160	
aac aac cct tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn	
165 170 175	
cag cca cct aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa	576
Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gca aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag	624
Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
195 200 205	
caa cct gat ctc aac tgg gat aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ctc cgc ttc tgg ctg gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gtg gca act tat tcc aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
cct gaa caa cag aaa aat ttt gct gaa caa tac acc atg ggd cct aat	816
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Xaa Pro Asn	
260 265 270	
att cat cga tac att cag gaa atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cgg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	
275 280 285	
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg	912
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	
290 295 300	
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	
305 310 315 320	

ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His	
325 330 335	
aag tcg tgg tcg ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat	1056
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp	
340 345 350	
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gac aac cat	1104
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg	1200
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc	1296
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu	
435 440 445	
gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag	1392
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt	1440
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac scc gaa cgc gaa gaa acc	1488
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Xaa Glu Arg Glu Glu Thr	
485 490 495	
cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc	1536
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg	
500 505 510	
cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca	1584
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro	
515 520 525	
cag gac aat acc gtt tat gcc tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt	1632
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg	
530 535 540	
tat ctg gtc gtg gtg aac ttt aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc	1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu	
545 550 555 560	
ccg gct aat gat gcc atc gag gaa gtg gtc att gat act cag cag caa	1728
Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln	
565 570 575	
ggg gcg ccg cac agc aca tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca ggt	1776
Gly Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly	
580 585 590	

gcg tat aag ctg cgg taa
 Ala Tyr Lys Leu Arg
 595

<210> 10
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Enterobacter sp.

<400> 10
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30
 Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
 35 40 45
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln
 100 105 110
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala
 115 120 125
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140
 His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys
 145 150 155 160
 Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn
 165 170 175
 Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255
 Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Xaa Pro Asn
 260 265 270
 Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr
 275 280 285
 Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser
 290 295 300
 Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His
 325 330 335

[illegible]

```

<210> 11
<211> 1803
<212> DNA
<213> Serratia plymuthica
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1800)
<223> coding for sucrose isomerase
<400> 11
atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca 48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
      1              5              10              15
tca tta agc gtc tca tgc cag caa gcc tta ggt acg caa caa ccc ttg 96
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu
      20              25              30

```

ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
aag gag gct gtt ttt tat cag gtg tat ccg cgt tcc ttt aaa gac act	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac ggg gat ggt atc ggg gat att aaa ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat tta aaa gct ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gac tcc ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgt aac atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgt ggc tat tac ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aac ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ttg cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgc ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gac ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gct gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aga gaa gtt ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcc act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	

ata aaa ttc ttc gat cgc cgt cgc gat gag ctg aac atc gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gag tgg aaa ttg tcg caa ttc cga cag gtc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gcc ggc gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcc cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtg aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg aca ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat acg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
aag gtc aat cca aac tac cag gaa atc aat gcg gta agt caa gtc gca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala	
485 490 495	
cag ccc gac tcg gta ttt aat tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500 505 510	
cat aac atc ccg gca ctg acc tat ggc aca tac acc gat ttg gat cct	1584
His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa	1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtt gtc gtt aac ttc cag gaa caa gtg atg aga tat aaa tta	1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu	
545 550 555 560	
ccg gat aat cta tcc atc gag aaa gtg att ata gaa agc aac agc aaa	1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys	
565 570 575	

1776

1803

<210> 12

<211> 600

<212> PRT

<213> Serratia plymuthica

<400> 12

Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr

Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu

Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp

Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr

Asn Gly Asn Gly Ile Gly Asn Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp

Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys

Tle Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn

His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys

Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly

Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln

Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr

Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr

Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn

Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr

Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser

Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr	305	310	315	320
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Arg	Trp	Arg	Arg	325	330	335	
Lys	Glu	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Asp	340	345	350	
Arg	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His	355	360	365	
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp	370	375	380	
Arg	Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg	385	390	395	400
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr	405	410	415	
Pro	Phe	Lys	Ala	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Phe	420	425	430	
Trp	His	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Phe	Leu	435	440	445	
Gln	Asn	Val	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln	450	455	460	
Trp	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Phe	465	470	475	480
Lys	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Gln	Glu	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Ala	485	490	495	
Gln	Pro	Asp	Ser	Val	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ile	Lys	Ile	Arg	500	505	510	
His	Asn	Ile	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro	515	520	525	
Ala	Asn	Asp	Ser	Val	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Lys	530	535	540	
Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	Phe	Gln	Glu	Gln	Val	Met	Arg	Tyr	Lys	Leu	545	550	555	560
Pro	Asp	Asn	Leu	Ser	Ile	Glu	Lys	Val	Ile	Ile	Glu	Ser	Asn	Ser	Lys	565	570	575	
Asn	Val	Val	Lys	Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	Lys	Pro	Trp	Gln	580	585	590	
Ser	Gly	Val	Tyr	Lys	Leu	Asn	Gln									595	600		

<210> 13

<211> 1844

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for
fusion-protein of signal peptide from proteinase
inhibitor I and Sucrose isomerase from Erwinia
rhapontici

<220>

<221> CDS

<222> (24) .. (1835)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (24)..(143)

<223> signal peptide from proteinase inhibitor I

<220>

<221> misc_feature

<222> (144)..(1835)

<223> coding for mature peptide of sucrose isomerase
from *Erwinia rhapontici* (palI)

<400> 13

```

ggtaccctaa ttaattatcc atc atg gat gtt cac aag gaa gtt aat ttc gtt 53
      Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val
                1                5                10

gct tac cta cta att gtt ctt gga tta ttg gta ctt gta agc gcg atg 101
Ala Tyr Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met
                15                20                25

gag cat gtt gat gcg aag gct tgc acc gaa ttg ggg atc ctc acc gtt 149
Glu His Val Asp Ala Lys Ala Cys Thr Glu Leu Gly Ile Leu Thr Val
                30                35                40

cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg aag cag gct gtt ttt tat 197
Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val Phe Tyr
                45                50                55

cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg aat ggg gat ggc att ggg 245
Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly
                60                65                70

gat tta aac ggt att att gag aat tta gac tat ctg aag aaa ctg ggt 293
Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys Leu Gly
                75                80                85                90

att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac gat tcg ccg aat acg gat 341
Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp
                95                100                105

aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag ata atg aaa gaa tac ggt 389
Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly
                110                115                120

acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca gaa atg aag aaa cgc aat 437
Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys Arg Asn
                125                130                135

atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac cac acc agc gat cag cat 485
Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His
                140                145                150

gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag aac aac ccc tac agg gac 533
Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp
                155                160                165                170

tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc cat gcc ccc aat aac tat 581
Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn Asn Tyr
                175                180                185

ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa aaa gac gat aaa tca ggc 629
Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys Ser Gly
                190                195                200

cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag caa ccc gac ctc aac tgg 677
Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp
                205                210                215

```

gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat gac atg ctc cgc ttc tgg	725
Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp	
220 225 230	
tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt gat acc gtt gcc acc tac	773
Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr	
235 240 245 250	
tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc caa cag cag tta aaa aat	821
Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser Gln Gln Gln Leu Lys Asn	
255 260 265	
ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa att cac gac tac gtg aat	869
Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr Val Asn	
270 275 280	
gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat gat atc gcc act gcg ggg	917
Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr Ala Gly	
285 290 295	
gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg att aag ttt ttc gat cgc	965
Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe Asp Arg	
300 305 310	
cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg ttt gat ctg atc agg ctc	1013
Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Leu	
315 320 325 330	
gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga aaa gac tgg acc ctt tcg	1061
Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr Leu Ser	
335 340 345	
cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac caa acg gca gga gag tat	1109
Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly Glu Tyr	
350 355 360	
ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac gac aat ccc cgc gcg gtt	1157
Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val	
365 370 375	
tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg cgc gag cat gcg gcg aaa	1205
Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala Ala Lys	
380 385 390	
gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt gca acg ccg ttt atc tat	1253
Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr	
395 400 405 410	
cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat ccc ttt aaa aaa atc gat	1301
Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp	
415 420 425	
gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt tgg caa gac tac gtt gaa	1349
Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu	
430 435 440	
aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt caa aac gta cgc caa acc	1397
Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr	
445 450 455	
agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag tgg gat gca agc aaa aac	1445
Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn	
460 465 470	
gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta aaa atc aat ccc aat tat	1493
Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr	
475 480 485 490	

```

aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat aat cca aat tcc gta ttt 1541
Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe
      495                      500                      505

aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc cat gac atc cct gcc ttg 1589
Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu
      510                      515                      520

acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct gac aac aat tca gtc tat 1637
Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr
      525                      530                      535

gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa tat ctt gtg gtc att aat 1685
Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val Ile Asn
      540                      545                      550

ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg ccc ggg gat tta tcc atc 1733
Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu Ser Ile
555                      560                      565                      570

aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac act att gtg aat aaa aat 1781
Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn Lys Asn
      575                      580                      585

gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag tcg ggc att tat aaa ctt 1829
Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Leu
      590                      595                      600

aat ccg taggtcgac 1844
Asn Pro

<210> 14
<211> 604
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for
      fusion-protein of signal peptide from proteinase
      inhibitor I and Sucrose isomerase from Erwinia
      rhapontici

<400> 14
Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val Ala Tyr Leu Leu Ile Val
  1                      5                      10                      15
Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met Glu His Val Asp Ala Lys
      20                      25                      30
Ala Cys Thr Glu Leu Gly Ile Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu
      35                      40                      45
Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser
      50                      55                      60
Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile
      65                      70                      75                      80
Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile
      85                      90                      95
Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg
      100                      105                      110
Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp
      115                      120                      125
Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp
      130                      135                      140
Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser
145                      150                      155                      160

```

Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp
 165 170 175
 Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly
 180 185 190
 Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr
 195 200 205
 Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg
 210 215 220
 Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser
 225 230 235 240
 Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe
 245 250 255
 Pro Asp Leu Ser Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr
 260 265 270
 Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val
 275 280 285
 Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro
 290 295 300
 Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn
 305 310 315 320
 Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu
 325 330 335
 Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val
 340 345 350
 Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe
 355 360 365
 Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp
 370 375 380
 Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly
 405 410 415
 Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu
 420 425 430
 Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala
 435 440 445
 Glu Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg
 450 455 460
 Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala
 485 490 495
 Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu
 500 505 510
 Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile
 515 520 525
 Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu
 530 535 540

Gly	Ala	Glu	Lys	Tyr	Leu	Val	Val	Ile	Asn	Phe	Lys	Glu	Glu	Val	Met
545					550				555						560
His	Tyr	Thr	Leu	Pro	Gly	Asp	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Val	Ile	Thr	Glu
				565					570					575	
Asn	Asn	Ser	His	Thr	Ile	Val	Asn	Lys	Asn	Asp	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu
			580					585					590		
Glu	Pro	Trp	Gln	Ser	Gly	Ile	Tyr	Lys	Leu	Asn	Pro				
		595					600								

<210> 15

<211> 2477

<212> DNA

<213> Klebsiella sp.

<220>

<221> CDS

<222> (214)..(2007)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 15

```

gatatcactg gtattatgga gtattatact ccccccttat ttactcatca aagccaggcg 60
ttccactctg cctccggtat ataactttcc gggaaacaat cccttcctga aaataattat 120
tgttaccgga gtcatactct ggctattgat gatttacgct tttctttaat aacaattcgt 180
ctcattcaca actgactttg caaggaaatt att atg tct ttt gtt acg cta cgt 234
                                Met Ser Phe Val Thr Leu Arg
                                1                               5

acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct ttg ata ata agt ctg gcc tgc 282
Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys
      10                               15                               20

ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg aat cag gat att cac gtt caa 330
Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu Asn Gln Asp Ile His Val Gln
      25                               30                               35

aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg aaa gaa gct gtt ttt tat cag 378
Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln
      40                               45                               50                               55

atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat ggc att ggc gat 426
Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp
      60                               65                               70

att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa tcg ctc ggt att 474
Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile
      75                               80                               85

gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg aac acc gat aac 522
Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn
      90                               95                               100

ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa gag tat ggc aca 570
Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr
      105                               110                               115

atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa aaa cga aat atg 618
Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys Lys Arg Asn Met
      120                               125                               130                               135

cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac cat acc agt gat caa cac ccg 666
Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His Pro
      140                               145                               150

```


tgg	ttt	att	cag	agt	aaa	agc	gat	aaa	aac	aac	cct	tat	cgt	gac	tat	714
Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	
			155					160					165			
tat	ttc	tgg	cgt	gac	gga	aaa	gat	aat	cag	cca	cct	aat	aat	tac	ccc	762
Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	
		170					175					180				
tca	ttt	ttc	ggc	ggc	tcg	gca	tgg	caa	aaa	gat	gca	aag	tca	gga	cag	810
Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	
	185					190					195					
tac	tat	tta	cac	tat	ttt	gcc	aga	cag	caa	cct	gat	ctc	aac	tgg	gat	858
Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln	Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	
200					205					210					215	
aac	ccg	aaa	gta	cgt	gag	gat	ctt	tac	gca	atg	ctc	cgc	ttc	tgg	ctg	906
Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr	Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	
				220					225					230		
gat	aaa	ggc	gtt	tca	ggc	atg	cga	ttt	gat	acg	gtg	gca	act	tat	tcc	954
Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe	Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	
			235					240					245			
aaa	atc	ccg	gga	ttt	ccc	aat	ctg	aca	cct	gaa	caa	cag	aaa	aat	ttt	1002
Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	Phe	
		250					255					260				
gct	gaa	caa	tac	acc	atg	ggg	cct	aat	att	cat	cga	tac	att	cag	gaa	1050
Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Asn	Ile	His	Arg	Tyr	Ile	Gln	Glu	
	265					270					275					
atg	aac	cgg	aaa	gtt	ctg	tcc	cgg	tat	gat	gtg	gcc	acc	gcg	ggg	gaa	1098
Met	Asn	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Arg	Tyr	Asp	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	
280					285					290					295	
att	ttt	ggc	gtc	ccg	ctg	gat	cgt	tcg	tcg	cag	ttt	ttt	gat	cgc	cgc	1146
Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Arg	Ser	Ser	Gln	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	
				300						305				310		
cga	cat	gag	ctg	aat	atg	gcg	ttt	atg	ttt	gac	ctc	att	cgt	ctc	gat	1194
Arg	His	Glu	Leu	Asn	Met	Ala	Phe	Met	Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	
			315					320					325			
cgc	gac	agc	aat	gaa	cgc	tgg	cgt	cac	aag	tcg	tgg	tcg	ctc	tct	cag	1242
Arg	Asp	Ser	Asn	Glu	Arg	Trp	Arg	His	Lys	Ser	Trp	Ser	Leu	Ser	Gln	
			330				335					340				
ttc	cgc	cag	atc	atc	agc	aaa	atg	gat	gtc	acg	gtc	gga	aag	tat	ggc	1290
Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Ser	Lys	Met	Asp	Val	Thr	Val	Gly	Lys	Tyr	Gly	
	345					350					355					
tgg	aac	acg	ttc	ttc	tta	gat	aac	cat	gac	aac	ccc	cgt	gcg	gta	tct	1338
Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His	Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	
360					365					370					375	
cac	ttc	ggg	gat	gac	agg	ccg	caa	tgg	cgg	gag	gcg	tcg	gct	aag	gca	1386
His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp	Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	
				380					385					390		
ctg	gcg	acg	att	acc	ctc	act	cag	cgg	gcg	acg	ccg	ttt	att	tat	cag	1434
Leu	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	
			395				400					405				
ggg	tca	gag	ctg	gga	atg	act	aat	tat	ccc	ttc	agg	caa	ctc	aac	gaa	1482
Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr	Pro	Phe	Arg	Gln	Leu	Asn	Glu	
		410					415					420				

ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc tgg cag gat tat gtc cag agt 1530
 Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser
 425 430 435
 gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc gat aat gtg cgc ctg acg agc 1578
 Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser
 440 445 450 455
 cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag tgg aat gac acc ctg aat gct 1626
 Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala
 460 465 470
 ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt cac atc aac cca aac tat gtg 1674
 Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe His Ile Asn Pro Asn Tyr Val
 475 480 485
 gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc cgc gaa gat tca gtg ctg aat 1722
 Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn
 490 495 500
 tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc cac cat atc cct gct ctg gta 1770
 Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg His His Ile Pro Ala Leu Val
 505 510 515
 tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca cag gac aat acc gtt tat gcc 1818
 Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala
 520 525 530 535
 tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt tat ctg gtc gtg gtg aac ttt 1866
 Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg Tyr Leu Val Val Val Asn Phe
 540 545 550
 aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc ccg gct aat gat gcc atc gag 1914
 Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu
 555 560 565
 gaa gtg gtc att gat act cag cag cag gcg gct gcg ccg cac agc aca 1962
 Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln Ala Ala Ala Pro His Ser Thr
 570 575 580
 tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca ggt gtg tat aag ctg cgg 2007
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly Val Tyr Lys Leu Arg
 585 590 595
 taatcacctg ggggattgat gacaagttcc ccagacaata gagttttcca ggtcttttagc 2067
 actgctgtgc tcagcgatag ttgtgctctc ctgtgacttc gtaagtgcct gtctcatggc 2127
 aggcattgtc aggtcagaag ccttctcagg cagcctcgag taacagcgcc cagttagcat 2187
 cccctgaaa gatgggggggt atgtataaat tagcgttaaa gaacatgaac cagccaccgt 2247
 catcttatca accaacaggc gagatgagct ccgattcctg attcttcaca ttgccgttga 2307
 tgcgcctgaa gcctcgccct ttagggccgg gaaataagca cagcatctgg cgatctcttt 2367
 tgccacttta ctgatcacat ccggcctcat ccatttcagg gcggcttcag ccatcaggag 2427
 aaagggtagt ggtcgtgtat atgagccagg ccaaaaaaag gtgtgatatc 2477
 <210> 16
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> Klebsiella sp.
 <400> 16
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30

Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp
		35					40					45			
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr
	50					55					60				
Asn	Asp	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp
65					70					75					80
Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr
				85					90					95	
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln
			100					105				110			
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala
		115					120					125			
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn
	130					135					140				
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys
145					150					155					160
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn
				165					170					175	
Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln
			180					185					190		
Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln
		195					200					205			
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr
	210					215					220				
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe
225					230					235					240
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Arg	Tyr	Ile	Gln	Glu	Met	Asn	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Arg	Tyr
		275					280					285			
Asp	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Arg	Ser
	290					295					300				
Ser	Gln	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	His	Glu	Leu	Asn	Met	Ala	Phe	Met
305					310					315					320
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asn	Glu	Arg	Trp	Arg	His
				325					330					335	
Lys	Ser	Trp	Ser	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Ser	Lys	Met	Asp
			340					345					350		
Val	Thr	Val	Gly	Lys	Tyr	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
		355					360					365			
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
	370					375					380				
Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg
385					390					395					400
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr
				405					410					415	

Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
420 425 430
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
435 440 445
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
450 455 460
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
465 470 475 480
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr
485 490 495
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
500 505 510
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
515 520 525
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
530 535 540
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
545 550 555 560
Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
565 570 575
Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala
580 585 590
Gly Val Tyr Lys Leu Arg
595

<210> 17

<211> 1797

<212> DNA

<213> Klebsiella sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1794)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 17

atg tct ttt gtt acg cta cgt acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct	48
Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser	
1 5 10 15	
ttg ata ata agt ctg gcc tgc ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg	96
Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu	
20 25 30	
aat cag gat att cac gtt caa aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg	144
Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp	
35 40 45	
aaa gaa gct gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aat gat gat ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac	240
Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat ctg aaa tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac	288
Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	

gac tct ccg aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln	
100 105 110	
ata atg aaa gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cat acc agt gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa	480
His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys	
145 150 155 160	
aac aac cct tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn	
165 170 175	
cag cca cct aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa	576
Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gca aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag	624
Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
195 200 205	
caa cct gat ctc aac tgg gat aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ctc cgc ttc tgg ctg gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gtg gca act tat tcc aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
cct gaa caa cag aaa aat ttt gct gaa caa tac acc atg ggg cct aat	816
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cga tac att cag gaa atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cgg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	
275 280 285	
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg	912
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	
290 295 300	
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	
305 310 315 320	
ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His	
325 330 335	
aag tcg tgg tcg ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat	1056
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp	
340 345 350	
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gat aac cat	1104
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	

gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg 1152
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 cgg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg 1200
 Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat 1248
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc 1296
 Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc 1344
 Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
 435 440 445
 gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag 1392
 Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt 1440
 Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc 1488
 His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr
 485 490 495
 cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc 1536
 Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
 500 505 510
 cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca 1584
 His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
 515 520 525
 cag gac aat acc gtt tat gcc tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt 1632
 Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
 530 535 540
 tat ctg gtc gtg gtg aac ttt aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc 1680
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 ccg gct aat gat gcc atc gag gaa gtg gtc att gat act cag cag cag 1728
 Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
 565 570 575
 gcg gct gcg ccg cac agc aca tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca 1776
 Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala
 580 585 590
 ggt gtg tat aag ctg cgg taa 1797
 Gly Val Tyr Lys Leu Arg
 595

<210> 18

<211> 598

<212> PRT

<213> Klebsiella sp.

<400> 18

Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Leu
			20					25					30		
Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp
		35					40					45			
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr
	50					55					60				
Asn	Asp	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp
65					70					75					80
Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr
				85					90					95	
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln
			100					105					110		
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala
		115					120					125			
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn
	130					135					140				
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys
145					150					155					160
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn
				165					170					175	
Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln
			180					185					190		
Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln
		195					200					205			
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr
	210					215					220				
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe
225					230					235					240
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Gly	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Arg	Tyr	Ile	Gln	Glu	Met	Asn	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Arg	Tyr
		275					280					285			
Asp	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Arg	Ser
	290					295					300				
Ser	Gln	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	His	Glu	Leu	Asn	Met	Ala	Phe	Met
305					310					315					320
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asn	Glu	Arg	Trp	Arg	His
				325					330				335		
Lys	Ser	Trp	Ser	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Ser	Lys	Met	Asp
			340					345					350		
Val	Thr	Val	Gly	Lys	Tyr	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
		355					360					365			
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
	370					375					380				
Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg
385					390					395					400

Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
 435 440 445
 Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr
 485 490 495
 Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
 500 505 510
 His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
 515 520 525
 Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
 565 570 575
 Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala
 580 585 590
 Gly Val Tyr Lys Leu Arg
 595

<210> 19

<211> 471

<212> DNA

<213> Enterobacter sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(471)

<223> coding for fragment of sucrose isomerase

<400> 19

gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat 48
 Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp
 1 5 10 15
 ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa 96
 Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys
 20 25 30
 tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg 144
 Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro
 35 40 45
 aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa 192
 Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys
 50 55 60
 gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa 240
 Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys
 65 70 75 80

<400> 20															
Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	Asn	Asp	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	Tyr	Leu	Lys
			20					25					30		
Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Pro
		35					40					45			
Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln	Ile	Met	Lys
	50					55					60				
Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala	Glu	Met	Lys
65					70					75					80
Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Thr	Ser
				85					90					95	
Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro
			100					105					110		
Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	Gln	Pro	Pro
		115					120					125			
Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	Lys	Asp	Ala
	130					135					140				
Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln			
145					150					155					

```
<400> 21
atg ctt atg aag aga tta ttc gcc gcg tct ctg atg ctt gct ttt tca 48
```

Met 1	Leu	Met	Lys	Arg 5	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser 10	Leu	Met	Leu	Ala	Phe 15	Ser	
agc	gtc	tcc	tct	gtg	agg	gct	gag	gag	gcc	gta	aag	ccg	ggc	gcg	cca	96
Ser	Val	Ser	Ser	Val	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	
			20					25					30			
tgg	tgg	aaa	agt	gct	gtc	ttc	tat	cag	gtc	tat	ccg	cgc	tcg	ttc	aag	144
Trp	Trp	Lys	Ser	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	
		35					40				45					
gat	acc	aac	ggt	gat	ggg	atc	ggc	gat	ttc	aaa	gga	ctg	acg	gag	aag	192
Asp	Thr	Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Phe	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Lys	
	50					55					60					
ctc	gac	tat	ctc	aag	ggg	ctc	ggc	ata	gac	gcc	atc	tgg	atc	aat	cca	240
Leu	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	
65					70					75					80	
cat	tac	gcg	tct	ccc	aac	acc	gat	aat	ggc	tac	gat	atc	agc	gac	tat	288
His	Tyr	Ala	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asp	Tyr	
				85					90					95		
cga	gag	gtc	atg	aag	gaa	tat	ggg	acg	atg	gag	gac	ttc	gat	cgt	ctg	336
Arg	Glu	Val	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Leu	
			100					105					110			
atg	gct	gag	ttg	aag	aag	cgc	ggc	atg	cgg	ctc	atg	gtt	gat	gtc	gtg	384
Met	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Arg	Gly	Met	Arg	Leu	Met	Val	Asp	Val	Val	
		115					120					125				
atc	aac	cat	tcg	agt	gac	caa	cac	gaa	tgg	ttc	aag	agc	agc	cgg	gcc	432
Ile	Asn	His	Ser	Ser	Asp	Gln	His	Glu	Trp	Phe	Lys	Ser	Ser	Arg	Ala	
	130					135					140					
tcc	aaa	gac	aat	ccc	tac	cgt	gac	tat	tat	ttc	tgg	cgt	gac	ggc	aaa	480
Ser	Lys	Asp	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	
145					150					155				160		
gac	ggt	cac	gag	cca	aac	aat	tac	cct	tcc	ttc	ttc	ggc	ggt	tcg	gca	528
Asp	Gly	His	Glu	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	
				165					170					175		
tgg	gag	aag	gac	ccc	gta	acc	ggg	caa	tat	tac	ctg	cat	tat	ttc	ggt	576
Trp	Glu	Lys	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Gly	
			180					185					190			
cgt	cag	cag	cca	gat	ctg	aac	tgg	gac	acg	ccg	aag	ctt	cgc	gag	gaa	624
Arg	Gln	Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Thr	Pro	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	
		195					200					205				
ctc	tat	gcg	atg	ctg	cgg	ttc	tgg	ctc	gac	aag	ggc	gta	tca	ggc	atg	672
Leu	Tyr	Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	
	210					215					220					
cgg	ttc	gat	acg	gtg	gct	acc	tac	tcg	aag	aca	ccg	ggt	ttc	ccg	gat	720
Arg	Phe	Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Asp	
225					230					235				240		
ctg	aca	ccg	gag	cag	atg	aag	aac	ttc	gcg	gag	gcc	tat	acc	cag	ggg	768
Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Met	Lys	Asn	Phe	Ala	Glu	Ala	Tyr	Thr	Gln	Gly	
				245					250					255		
ccg	aac	ctt	cat	cgt	tac	ctg	cag	gaa	atg	cac	gag	aag	gtc	ttc	gat	816
Pro	Asn	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Gln	Glu	Met	His	Glu	Lys	Val	Phe	Asp	
			260					265					270			
cat	tat	gac	gcg	gtc	acg	gcc	ggc	gaa	atc	ttc	ggc	gct	ccg	ctc	aat	864
His	Tyr	Asp	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn	
		275					280					285				

caa	gtg	ccg	ctg	ttc	atc	gac	agc	cgg	agg	aaa	gag	ctg	gat	atg	gct	912
Gln	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Arg	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Met	Ala	
290						295					300					
ttc	acc	ttc	gat	ctg	atc	cgt	tat	gat	cgc	gca	ctg	gat	cgt	tgg	cat	960
Phe	Thr	Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Tyr	Asp	Arg	Ala	Leu	Asp	Arg	Trp	His	
305					310					315					320	
acc	att	ccg	cgt	acc	tta	gcg	gac	ttc	cgt	caa	acg	atc	gat	aag	gtc	1008
Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Leu	Ala	Asp	Phe	Arg	Gln	Thr	Ile	Asp	Lys	Val	
				325					330					335		
gac	gcc	atc	gcg	ggc	gaa	tat	ggc	tgg	aac	acg	ttc	ttc	ctc	ggc	aat	1056
Asp	Ala	Ile	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Gly	Asn	
			340					345					350			
cac	gac	aat	ccc	cgt	gcg	gta	tcg	cat	ttt	ggc	gac	gat	cgg	ccg	caa	1104
His	Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	
		355					360					365				
tgg	cgc	gaa	gcc	tcg	gcc	aag	gct	ctg	gcc	acc	gtc	acc	ttg	acc	cag	1152
Trp	Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gln	
	370					375					380					
cga	gga	acg	ccg	ttc	atc	ttc	caa	gga	gat	gaa	ctc	gga	atg	acc	aac	1200
Arg	Gly	Thr	Pro	Phe	Ile	Phe	Gln	Gly	Asp	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	
385					390					395					400	
tac	ccc	ttc	aag	acg	ctg	cag	gac	ttt	gat	gat	atc	nnn	nnn	nnn	nnn	1248
Tyr	Pro	Phe	Lys	Thr	Leu	Gln	Asp	Phe	Asp	Asp	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
				405				410					415			
nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	1296
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			420					425					430			
nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnn	nnt	gtg	gcg	ttg	act	1344
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Ala	Leu	Thr
			435				440						445			
agc	cga	gca	aac	gcc	cgc	acg	ccc	ttt	caa	tgg	gat	gac	agt	gct	aat	1392
Ser	Arg	Ala	Asn	Ala	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln	Trp	Asp	Asp	Ser	Ala	Asn	
	450					455					460					
gcg	gga	ttc	aca	act	ggc	aag	cct	tgg	cta	aag	gtc	aat	cca	aac	tac	1440
Ala	Gly	Phe	Thr	Thr	Gly	Lys	Pro	Trp	Leu	Lys	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	
465					470					475					480	
act	gag	atc	aac	gcc	gcg	cgg	gaa	att	ggc	gat	cct	aaa	tcg	gtc	tac	1488
Thr	Glu	Ile	Asn	Ala	Ala	Arg	Glu	Ile	Gly	Asp	Pro	Lys	Ser	Val	Tyr	
				485					490					495		
agc	ttt	tac	cgc	aac	ctg	atc	tca	atc	cgg	cat	gaa	act	ccc	gct	ctt	1536
Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Leu	Ile	Ser	Ile	Arg	His	Glu	Thr	Pro	Ala	Leu	
			500					505					510			
tcg	acc	ggg	agc	tat	cgc	gac	atc	gat	ccg	agt	aat	gcc	gat	gtc	tat	1584
Ser	Thr	Gly	Ser	Tyr	Arg	Asp	Ile	Asp	Pro	Ser	Asn	Ala	Asp	Val	Tyr	
		515					520					525				
gcc	tat	acg	cgc	agc	cag	gat	ggc	gag	acc	tat	ctg	gtc	gta	gtc	aac	1632
Ala	Tyr	Thr	Arg	Ser	Gln	Asp	Gly	Glu	Thr	Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	
	530					535					540					
ttc	aag	gca	gag	cca	agg	agt	ttc	acg	ctt	ccg	gac	ggc	atg	cat	att	1680
Phe	Lys	Ala	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Thr	Leu	Pro	Asp	Gly	Met	His	Ile	
545					550					555					560	

```

gcc gaa acc ctg att gag agc agt tcg cca gca gct ccg gcg gcg ggg 1728
Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
                    565                    570                    575

gct gca agc ctt gag ctg cag cct tgg cag tcc ggc atc tac aag gtg 1776
Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Val
                    580                    585                    590

aag taa 1782
Lys

<210> 22
<211> 593
<212> PRT
<213> Pseudomonas mesoacidophila MX45
<400> 22
Met Leu Met Lys Arg Leu Phe Ala Ala Ser Leu Met Leu Ala Phe Ser
 1          5          10          15
Ser Val Ser Ser Val Arg Ala Glu Glu Ala Val Lys Pro Gly Ala Pro
          20          25          30
Trp Trp Lys Ser Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys
          35          40          45
Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Phe Lys Gly Leu Thr Glu Lys
          50          55          60
Leu Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro
          65          70          75          80
His Tyr Ala Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr
          85          90          95
Arg Glu Val Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu
          100          105          110
Met Ala Glu Leu Lys Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Val Asp Val Val
          115          120          125
Ile Asn His Ser Ser Asp Gln His Glu Trp Phe Lys Ser Ser Arg Ala
          130          135          140
Ser Lys Asp Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys
          145          150          155          160
Asp Gly His Glu Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala
          165          170          175
Trp Glu Lys Asp Pro Val Thr Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Gly
          180          185          190
Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Thr Pro Lys Leu Arg Glu Glu
          195          200          205
Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met
          210          215          220
Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Thr Pro Gly Phe Pro Asp
          225          230          235          240
Leu Thr Pro Glu Gln Met Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Gln Gly
          245          250          255
Pro Asn Leu His Arg Tyr Leu Gln Glu Met His Glu Lys Val Phe Asp
          260          265          270
His Tyr Asp Ala Val Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Ala Pro Leu Asn
          275          280          285

```

Gln	Val	Pro	Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Arg	Arg	Lys	Glu	Leu	Asp	Met	Ala		
290						295					300						
Phe	Thr	Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Tyr	Asp	Arg	Ala	Leu	Asp	Arg	Trp	His		
305					310					315					320		
Thr	Ile	Pro	Arg	Thr	Leu	Ala	Asp	Phe	Arg	Gln	Thr	Ile	Asp	Lys	Val		
				325					330					335			
Asp	Ala	Ile	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Thr	Phe	Phe	Leu	Gly	Asn		
			340					345					350				
His	Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln		
	355						360				365						
Trp	Arg	Glu	Ala	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Gln		
370						375					380						
Arg	Gly	Thr	Pro	Phe	Ile	Phe	Gln	Gly	Asp	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn		
385					390					395					400		
Tyr	Pro	Phe	Lys	Thr	Leu	Gln	Asp	Phe	Asp	Asp	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		
			405						410					415			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa		
			420						425					430			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Ala	Leu	Thr		
			435						440				445				
Ser	Arg	Ala	Asn	Ala	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln	Trp	Asp	Asp	Ser	Ala	Asn		
450						455					460						
Ala	Gly	Phe	Thr	Thr	Gly	Lys	Pro	Trp	Leu	Lys	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr		
465					470					475					480		
Thr	Glu	Ile	Asn	Ala	Ala	Arg	Glu	Ile	Gly	Asp	Pro	Lys	Ser	Val	Tyr		
			485						490					495			
Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Leu	Ile	Ser	Ile	Arg	His	Glu	Thr	Pro	Ala	Leu		
			500					505					510				
Ser	Thr	Gly	Ser	Tyr	Arg	Asp	Ile	Asp	Pro	Ser	Asn	Ala	Asp	Val	Tyr		
		515				520					525						
Ala	Tyr	Thr	Arg	Ser	Gln	Asp	Gly	Glu	Thr	Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn		
530					535						540						
Phe	Lys	Ala	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Thr	Leu	Pro	Asp	Gly	Met	His	Ile		
545					550					555					560		
Ala	Glu	Thr	Leu	Ile	Glu	Ser	Ser	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Gly		
			565						570					575			
Ala	Ala	Ser	Leu	Glu	Leu	Gln	Pro	Trp	Gln	Ser	Gly	Ile	Tyr	Lys	Val		
			580					585					590				

Lys

<210> 23

<211> 1417

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1417)

<223> promoter of lemni9

<400> 23

```

ataattttaac catctagaga tccacaaatc atgtttccat atcatggtag tagttggtgc 60
tacgaagtat ctataaatta ttgagaaata cctggtggaa tcccaagtga aacggaaagg 120
cccttactta ttaaataaaa aaacatttga caatagaaaa ttgagaccac tctgcatatg 180
aaacatcagg atccccacat ttcacaaatt ttacaagtta attaaagccct actctgtcca 240
tatggaactt ttctgcactt ccacgcacca acgaatatgc tgaaaattga tgttttagat 300
gtgtacgaat aaagcaatca aagaacgcgg gcgcaacgcg cgctggagac actgccattc 360
atgtgtgcct aacgtgtttt ctttagtcat tacgctccta ctaccgactc aatatatatt 420
aactatagta ttttttattt atgacgagaa acgtaatttt aaatgtagat atattttaac 480
aagctatgat aattacatct tgttgccgta gtcataaatg acacaaatta aggtttgatt 540
ttcgtccact tctaagattt cttgttctaa tactagtata tttctgattt aaaaagttat 600
ttagtttttt ttgaattagc tgataaatgc caaaaactga aaattaaagt actttttaat 660
tttataaaaa taatatcatg gaaattaaaa cgagaaatta atgaaaaagt agaagattgc 720
tttgccataa tatagtgtta cttttcgtat tattttatta agcgtaaaat tacataaagg 780
tatccgtgct taaatttcta gcttgagagc attttttgaa gcaaaaagttt cgataaatca 840
agttttaata taaaattaca atcatcattt ctaattatat taattcttta aaaataaaaat 900
taaaaaaata tatacaataa ttgaagctcg gataaattaa aatatgtaac tattaaatat 960
tactcgataa tattaatat ttttcgatta tattaatatg tagctcaaaa tatattaaat 1020
aataatacaa atataatta atatgtaaat catatacatt aaaaactatc ttaaataatat 1080
aatatgcagc tgtaatatat taaccagat acataagcac ctcgagtaca ttaaacaat 1140
aaaagaattt aaaaataata aaaataagtg aaagcaataa attgtatatt tctataattt 1200
atccctttat taatactaaa taaagttaga gaacctaaac aggaagcaca attatgacac 1260
gaggagagaa tagcgcgtca attgtgaccc tttagcgga agtatatgta ataaatagta 1320
gactcttttt ctatatattg atatcccata acaagagcag agatattcgt ttagcacaaa 1380
acaggcatac tattcaattc cttttcgttc cagaagc 1417

```

<210> 24

<211> 374

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(374)

<223> promoter of delta-0.3TobRB7

<400> 24

```

agcttatcta aacaaagttt taaattcatt tcttaaactt ccattacaat gtaatataac 60
ttagtcgtct caattaaacc attaatgtga aatataaatc aaaaaaagcc aaagggcggt 120
gggacggcgc caatcatttg tcctagtcca ctcaaataag gcccatggtc ggcaaaacca 180
aacacaaaat gtgttatttt taattttttc ctcttttatt gttaaagttg caaaatgtgt 240
tatttttggg aagaccctat ggatatataa agacagggtta tgtgaaactt ggaaaaccat 300
caagttttta gcaaaaccct cttaagaact taaattgagc ttcttttggg gcatttttct 360
agtgagaact aaaa 374

```

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 25

```

ggatccggta ccgttcagca atcaaat

```

27

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 26
gtcgacgtct tgccaaaaac ctt 23

<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 27
gtcgacctac gtgattaagt ttata 25

<210> 28
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 28
atcgaattca taatttaacc atctagag 28

<210> 29
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 29
atcggtacct gcttctggaa cgaaaggg 28

<210> 30
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 30
ggaattcagc ttatctaaac aaagttttaa attc 34

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 31
gggtaccagt tctcactaga aaaatgcccc 30

<210> 32
<211> 461

<212> DNA

<213> Wheat dwarf virus

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(461)

<223> V-sense promoter from Wheat Dwarf Virus

<400> 32

```
ccggcagggtc cttagcgaaa aaacgggggtg tgccagaaaa ctctatgctc taccctgcgt 60
ggaggtgtga attctgcaca ctgctaattgc aatgtgtcca atgctttata tagggcaggt 120
tttggcggga gaacagggcc cttgtgttcc cacgggagcg tagcgtatcg tgtgggccct 180
gttcgggtgtg tggtcggggg gcctccacgc ggggttataat attacccgcg gtggtggccc 240
ccgacgcgca ctcggtcttt cgtgagtgcg cggaggcttt tggaccacat cttttctgac 300
cactttcgtg gaatatgttg atttatcaca cttttgacgc ggaaatctgt gccatgcctt 360
agcttataag gaagtgcgtg gtagcccatc tcgatggagc aggcaatagc cccccgcctt 420
cctatacggg actatcaata ccagaccctt tccattcccg g 461
```

<210> 33

<211> 1173

<212> DNA

<213> Maize streak virus

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1173)

<223> V-sense promotor from Maize Streak Virus

<400> 33

```
aagcttattt gcagagtatt caaaatactg caattttgtg gaccaatcaa agggaagctc 60
tttctggatc atggagaggt actcttcttt ggaagtagcg tgtgaaataa tgtctcgcat 120
tatttcatct ttagaaggct ttttttcctt tacctctgaa tcagattttc cgaggaaggg 180
ggacttccta ggaatgaaag tacctctctc aaacacagcc agaggttcct tgagaatgta 240
atccctcacc ctgtttactg acttggcact ctgaatatatt ggggtgaaacc catttatatc 300
aaagaacctt gagtcagata tccttaccgg cttctctgtc tgaagcaatg catgtaaatg 360
caaacttcca tctttatgtg cctctcgggc acatagaatg tatttgggaa tccaacgaac 420
aacgagctcc cagatcatct gacaggcgat ttcaggattt tctggacact ttggataggt 480
taggaacgtg ttagcgttcc ggtgtgagaa ctgacggttg gatgaggagg aggccattgc 540
cgacgacgga ggttgaggct gagggatggc agactgggag ctccaaactc tatagtatac 600
ccgtgcgcct tcgcctcgag gcgaaatccg ccgctccctt gtcttgtagt ggttgcaaat 660
gggccgggacc gggccggccc agcaggaaaa gaaggcgcgc actaatatta ccgcgccttc 720
ttttcctgcg agggcccggt agggtcgacc ccgagcgatt tgatgtaaag tttggtcctg 780
ctttgtatga tttatctaaa gcagcccatt ctaaagaatc cgggtcccggt cactataaat 840
tgcctaacia gtgcgattca ttcattgcat cacagaacgc cctgtattat cagccgcggg 900
taccacagc agctccgaca tccggaggag tgccgtggag tcgcgtaggc gaggtagcta 960
ttttgagctt tgttgcatgt atttgctttt acctgcttta cctttgggtg ctgagagacc 1020
ttatcttagt tctgaaggct cgacaaggca gatccacgga ggagctgata tttggtggac 1080
aagctgtgga taggagcaac cctatcccta atataccagc accaccaagt cagggaatc 1140
ccgggccatt tgttccatcg actctagtcg acc 1173
```

<210> 34

<211> 353

<212> DNA

<213> Pepper huasteco virus

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(353)

<223> V-sense promoter from Pepper huasteco virus

<400> 34

```
catattttgta ataagagagg tgtacaccga ttggagctct ttaacctggg cttattgtat 60
cgggtgtattg gtagccaata tatagtatat gggagttatc taggatcttc gtacacgtga 120
```



```

gggccatccg ttataatatt accggatggc cgaccgctta ccttatctat ccgtactgct 180
ttatttgaat taaagatggt acttttatgc tatccaatga agcgtagcgt ctgggaagct 240
tagttatcag ttccagacgt ggggaccaag tagtgtatga ccactttatt gactgtcagc 300
tttataaatt gaaattaaaa cataagtggc ccatgtacct ttaattcaaa atg 353

```

<210> 35

<211> 1803

<212> DNA

<213> *Serratia plymuthica*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1800)

<223> coding for succrose isomerase

<400> 35

```

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca 48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
  1          5          10          15

tca tta agc gtc tca tgc cag caa gcc tta ggt acg caa caa ccc ttg 96
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu
          20          25          30

ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg 144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
          35          40          45

aag gag gct gtt ttt tat cag gtg tat ccg cgt tcc ttt aaa gac act 192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
          50          55          60

aac ggg gat ggt atc ggg gat att aaa ggc atc ata gaa aaa tta gac 240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
          65          70          75          80

tat tta aaa gct ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat 288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
          85          90          95

gac tcc ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa 336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
          100          105          110

atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct 384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
          115          120          125

gaa atg aaa aaa cgt aac atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac 432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
          130          135          140

cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag 480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys
          145          150          155          160

gat aat cct tat cgt ggc tat tac ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg 528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
          165          170          175

cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa 576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
          180          185          190

aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa 624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
          195          200          205

```

cag	cct	gac	cta	aac	tgg	gat	aac	ccc	aaa	gtc	cgt	caa	gat	ctt	tat	672
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr	
	210					215					220					
gca	atg	ttg	cgt	ttc	tgg	tta	gat	aaa	ggc	gtg	tct	ggg	tta	cgc	ttt	720
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe	
225					230					235					240	
gat	acg	gta	gcg	acc	tac	tca	aaa	att	ccg	gac	ttc	cca	aat	ctc	acc	768
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	
				245					250					255		
caa	caa	cag	ctg	aag	aat	ttt	gca	gct	gag	tat	acc	aag	ggc	cct	aat	816
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Ala	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Asn	
			260					265					270			
att	cat	cgt	tac	gtc	aat	gaa	atg	aat	aga	gaa	gtt	ttg	tct	cat	tac	864
Ile	His	Arg	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr	
		275					280					285				
gac	att	gcc	act	gcc	ggg	gaa	atc	ttt	ggc	gta	ccc	ttg	gat	caa	tcg	912
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Gln	Ser	
	290					295					300					
ata	aaa	ttc	ttc	gat	cgc	cgt	cgc	gat	gag	ctg	aac	atc	gca	ttt	acc	960
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr	
305					310					315					320	
ttt	gac	tta	atc	aga	ctc	gat	cga	gac	tct	gat	caa	aga	tgg	cgt	cga	1008
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Arg	Trp	Arg	Arg	
				325					330					335		
aaa	gag	tgg	aaa	ttg	tcg	caa	ttc	cga	cag	gtc	atc	gat	aac	gtt	gac	1056
Lys	Glu	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Asp	
			340					345					350			
cgt	act	gcc	ggc	gaa	tat	ggg	tgg	aat	gcc	ttc	ttc	ttg	gat	aac	cac	1104
Arg	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His	
		355					360					365				
gac	aat	ccg	cgc	gct	gtc	tcc	cac	ttt	ggc	gat	gat	cgc	cca	caa	tgg	1152
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp	
	370					375					380					
cgc	gag	cca	tcg	gct	aaa	gcg	ctt	gca	acc	ttg	acg	ctg	act	caa	cga	1200
Arg	Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg	
385					390					395					400	
gca	acg	cct	ttt	att	tat	caa	ggg	tca	gaa	ttg	ggc	atg	acc	aat	tac	1248
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr	
				405					410					415		
ccc	ttc	aaa	gct	att	gat	gaa	ttc	gat	gat	att	gag	gtg	aaa	ggg	ttt	1296
Pro	Phe	Lys	Ala	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Phe	
			420					425					430			
tgg	cat	gac	tac	gtt	gag	aca	gga	aag	gtg	aaa	gcc	gac	gag	ttc	ttg	1344
Trp	His	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Phe	Leu	
		435					440					445				
caa	aat	gta	cgc	ctg	acg	agc	agg	gat	aac	agc	cgg	aca	ccg	ttc	caa	1392
Gln	Asn	Val	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln	
	450					455					460					
tgg	gat	acg	agc	aaa	aat	gca	gga	ttc	acg	agc	gga	aaa	cct	tgg	ttc	1440
Trp	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Phe	
465					470					475					480	

```

aag gtc aat cca aac tac cag gaa atc aat gcg gta agt caa gtc gca 1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala
485 490 495

cag ccc gac tcg gta ttt aat tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg 1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg
500 505 510

cat aac atc ccg gca ctg acc tat ggc aca tac acc gat ttg gat cct 1584
His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro
515 520 525

gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa 1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys
530 535 540

tat ctt gtt gtc gtt aac ttc cag gaa caa gtg atg aga tat aaa tta 1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu
545 550 555

ccg gat aat cta tcc atc gag aaa gtg att ata gaa agc aac agc aaa 1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys
565 570 575

aac gtt gtg aaa aag aat gat tcc tta ctc gaa cta aaa cca tgg cag 1776
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
580 585 590

tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa 1803
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
595 600

```

<210> 36

<211> 600

<212> PRT

<213> Serratia plymuthica

<400> 36

```

Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
1 5 10 15
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu
20 25 30
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
35 40 45
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
50 55 60
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
65 70 75 80
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
85 90 95
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
100 105 110
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
115 120 125
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
130 135 140
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys
145 150 155 160
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
165 170 175

```

Gln	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln
			180					185					190		
Lys	Asp	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln
		195					200					205			
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr
	210					215					220				
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe
225					230					235					240
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr
				245					250					255	
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Ala	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Arg	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr
		275					280					285			
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Gln	Ser
	290					295					300				
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr
305					310					315					320
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Arg	Trp	Arg	Arg
				325					330					335	
Lys	Glu	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Val	Ile	Asp	Asn	Val	Asp
			340					345					350		
Arg	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His
		355					360					365			
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln	Trp
	370					375					380				
Arg	Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Arg
385					390					395					400
Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn	Tyr
				405					410					415	
Pro	Phe	Lys	Ala	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Phe
			420					425					430		
Trp	His	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Phe	Leu
		435					440					445			
Gln	Asn	Val	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Thr	Pro	Phe	Gln
	450					455					460				
Trp	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Gly	Lys	Pro	Trp	Phe
465					470					475					480
Lys	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Gln	Glu	Ile	Asn	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Ala
				485					490					495	
Gln	Pro	Asp	Ser	Val	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Arg	Gln	Leu	Ile	Lys	Ile	Arg
			500					505					510		
His	Asn	Ile	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro
		515					520					525			
Ala	Asn	Asp	Ser	Val	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Lys
	530					535					540				
Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	Phe	Gln	Glu	Gln	Val	Met	Arg	Tyr	Lys	Leu
545					550					555					560

Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys
565 570
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
580 585 590
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
595 600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/90 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 27003 A (KUNZ MARKWART ;MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG (DE); VOGEL MANFRED) 4 April 2002 (2002-04-04) page 14, line 5 - line 13 ---	8,9, 11-15
X	BOERNKE FREDERIK ET AL: "Potato tubers as bioreactors for palatinose production" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 96, no. 1, 13 June 2002 (2002-06-13), pages 119-124, XP002259504 ISSN: 0168-1656 the whole document ---	8,9, 11-15
X	WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENTIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16 August 2001 (2001-08-16) example 6 ---	8,9, 11-15
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

28 October 2003

Date of mailing of the International search report

13/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/027

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27 July 1995 (1995-07-27)</p>	
A	<p>WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16 August 2001 (2001-08-16)</p>	
A	<p>ROCHA-SOSA M ET AL: "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 8, no. 1, 1989, pages 23-29, XP002038303 ISSN: 0261-4189 page 28, left-hand column, last paragraph</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/027

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0227003	A	04-04-2002	DE 10047286 A1 AU 7639801 A CA 2421618 A1 WO 0227003 A1 EP 1322772 A1	04-04-2002 08-04-2002 19-03-2003 04-04-2002 02-07-2003
WO 0159136	A	16-08-2001	DE 10006462 A1 AU 3547401 A WO 0159136 A1 EP 1272645 A1	13-09-2001 20-08-2001 16-08-2001 08-01-2003
WO 9520047	A	27-07-1995	DE 4414185 C1 AU 1155495 A AU 688848 B2 AU 1534995 A BR 9500271 A CA 2140613 A1 DE 4447471 A1 DE 4447472 A1 WO 9520047 A2 EP 0740706 A1 FI 950187 A FI 962891 A JP 7250693 A NO 950194 A US 2003087416 A1 US 5786140 A US 5985622 A	07-09-1995 27-07-1995 19-03-1998 08-08-1995 17-10-1995 20-07-1995 31-08-1995 14-09-1995 27-07-1995 06-11-1996 20-07-1995 18-07-1996 03-10-1995 20-07-1995 08-05-2003 28-07-1998 16-11-1999
WO 0159135	A	16-08-2001	DE 10045113 A1 AU 3546001 A WO 0159135 A1 EP 1263971 A1 US 2003159181 A1	16-08-2001 20-08-2001 16-08-2001 11-12-2002 21-08-2003

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/027

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N9/90 C12N15/82

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02 27003 A (KUNZ MARKWART ;MATTES RALF (DE); SUEZUCKER AG (DE); VOGEL MANFRED) 4. April 2002 (2002-04-04) Seite 14, Zeile 5 - Zeile 13 ---	8,9, 11-15
X	BOERNKE FREDERIK ET AL: "Potato tubers as bioreactors for palatinose production" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 96, Nr. 1, 13. Juni 2002 (2002-06-13), Seiten 119-124, XP002259504 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ---	8,9, 11-15
X	WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENTIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) Beispiel 6 ---	8,9, 11-15

	---/---	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

28. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27. Juli 1995 (1995-07-27) ----	
A	WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) ----	
A	ROCHA-SOSA M ET AL: "BOTH DEVELOPMENTAL AND METABOLIC SIGNALS ACTIVATE THE PROMOTER OF A CLASS I PATATIN GENE" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 8, Nr. 1, 1989, Seiten 23-29, XP002038303 ISSN: 0261-4189 Seite 28, linke Spalte, letzter Absatz -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 05/0027

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0227003	A	04-04-2002	DE 10047286 A1 04-04-2002
		AU 7639801 A 08-04-2002	
		CA 2421618 A1 19-03-2003	
		WO 0227003 A1 04-04-2002	
		EP 1322772 A1 02-07-2003	
WO 0159136	A	16-08-2001	DE 10006462 A1 13-09-2001
		AU 3547401 A 20-08-2001	
		WO 0159136 A1 16-08-2001	
		EP 1272645 A1 08-01-2003	
WO 9520047	A	27-07-1995	DE 4414185 C1 07-09-1995
		AU 1155495 A 27-07-1995	
		AU 688848 B2 19-03-1998	
		AU 1534995 A 08-08-1995	
		BR 9500271 A 17-10-1995	
		CA 2140613 A1 20-07-1995	
		DE 4447471 A1 31-08-1995	
		DE 4447472 A1 14-09-1995	
		WO 9520047 A2 27-07-1995	
		EP 0740706 A1 06-11-1996	
		FI 950187 A 20-07-1995	
		FI 962891 A 18-07-1996	
		JP 7250693 A 03-10-1995	
		NO 950194 A 20-07-1995	
		US 2003087416 A1 08-05-2003	
		US 5786140 A 28-07-1998	
		US 5985622 A 16-11-1999	
WO 0159135	A	16-08-2001	DE 10045113 A1 16-08-2001
		AU 3546001 A 20-08-2001	
		WO 0159135 A1 16-08-2001	
		EP 1263971 A1 11-12-2002	
		US 2003159181 A1 21-08-2003	

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

- 10 Palatinose (Isomaltulose) und Trehalulose werden großtechnisch aus Saccharose durch eine enzymatische Umlagerung unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen hergestellt. Dabei wird die zwischen den Monosacchariden des Disaccharids Saccharose bestehende ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zu einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung
- 15 bei Palatinose bzw. einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung bei Trehalulose isomerisiert. Diese Umlagerung von Saccharose zu den beiden nicht-kariogenen Disacchariden erfolgt unter Katalyse des bakteriellen Enzyms Saccharoseisomerase, auch Saccharosemutase genannt. Entsprechende Sequenzen sind beispielsweise in WO 95/20047
- 20 (US 5,786,140; US 5,985,622) beschrieben.

Ferner sind beschrieben Saccharoseisomerasen aus *Erwinia rhapontici* (palI Gen, GenBank Acc.-No.: AF279281; Börnke et al. (2001) J Bacteriol 183(8):2425-2430) und *Klebsiella* sp. Strain

- 25 LX3 (GenBank Acc.-No.: AY040843; Zhang et al. (2002) Appl Environ Microbiol (68):2676-2682).

WO 01/59136 beschreibt Verfahren zur direkten Herstellung nicht-kariogener Zucker direkt in transgenen Pflanzen, die rekombinante

30 Nukleinsäuremoleküle kodierend für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Saccharoseisomerase enthalten. Beschrieben sind Expressionskonstrukte für besagte Saccharoseisomerase zur Expression in Pflanzen, sowie die mit denselben transformierten transgenen Pflanzen.

35

WO 01/59135 beschreibt Verfahren zur Beeinflussung der Pollenentwicklung unter Verwendung von antheren-, tapetum oder pollen-spezifisch exprimierten Saccharoseisomerasen. Die konstitutive Expression der Saccharoseisomerase in Pflanzen hat jedoch nach-

40 teilige Wirkung auf das Wachstum der Pflanze (Börnke F et al. (2002) Planta 214:356-364).

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel

- 45 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehr-

2

- mechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken.
- 5 Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen unter Kontrolle des 35 S CaMV Promoters (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promoters
- 10 (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.
- 15 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endo-
- 20 genen Botenstoffen wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward, et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes, et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-
- 25 S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J. 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hoch-regulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
- 30 In Gerste ist bereits seit längerem der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und vor allem rassen-unspezifische Resistenz beispielsweise
- 35 gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Das Mlo-Gen wurde erst kürzlich kloniert (Büschges R et al. (1997) Cell :695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000)
- 40 Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung von Mlo-Genen zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Unklar ist, ob ein Mlo-basierter Ansatz auch in dikotyledonen Pflanzen praktikabel ist.

Generell leben pflanzenpathogene Pilzarten saprophytisch oder parasitisch. Letztere sind - zumindest in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus - auf ein Wirkstoffangebot (z.B. ein Angebot an Vitaminen, Kohlenhydraten usw.) angewiesen, wie es in dieser Form
5 nur von lebenden Pflanzenzellen bereitgestellt werden kann. Der Fachmann unterscheidet parasitäre Pilze in nekrotrophe, hemibiotrophe und biotrophe. Bei nekrotrophen pilzlichen Parasiten führt die Infektion zur Gewebeerstörung und damit zum Tod der Pflanze. Diese Pilze sind meist nur fakultativ parasitär; sie können sich
10 ebenso gut saprophytisch in totem oder absterbendem Pflanzenmaterial vermehren.

Biotrophe pilzliche Parasiten sind dadurch charakterisiert, dass Parasit und Wirt, zumindest über längere Zeiträume hinweg,
15 zusammenleben. Der Pilz entnimmt dem Wirt Nährstoffe, tötet ihn jedoch nicht ab. Die meisten biotrophen Pilze sind obligate Parasiten. Hemibiotrophe Pilze leben zeitweise biotroph und töten den Wirt zu einem späteren Zeitpunkt ab, d.h. sie wechseln in eine nekrotrophe Phase.

20 Einer weitere große Gruppe biotropher pflanzlicher Pathogene von enormer agro-ökonomischer Bedeutung stellen Nematoden dar. Pflanzenpathogene Nematoden entnehmen ihre Nahrung aus den äußeren pflanzlichen Gewebeabschnitten (Ektoparasiten) oder nach
25 dem Eindringen in die Pflanze aus tiefer liegenden Zellschichten (Endoparasiten). Bei den endoparasitären Wurzelnematoden unterscheidet man nach ihrer Lebens- und Ernährungsweisen zwischen zwei Gruppen: Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) und Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten). Bei
30 beiden Gruppen handelt es sich um obligate biotrophe Parasiten, die in den Wurzeln die Bildung spezieller Nährzellen induzieren. Bei diesen Nährzellen handelt es sich um Pflanzenzellen, deren Stoffwechsel von den Nematoden so verändert wurde, dass sie gezielt der Ernährung der sich entwickelten Nematoden dienen. Endo-
35 parasitäre Wurzelnematoden sind in ihrer Entwicklung von diesen Nährzellen absolut abhängig (zur Übersicht siehe Sijmons et al. (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32: 235-259). Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) verbleiben an der Parasitierungsstelle in der Wurzel (sessile Endoparasiten)
40 wandeln die sie umgebenden Zellen durch Protoplastenfusion bei teilweiser Zellwandauflösung in Syncytien um. Diesen Nährzellen, die im Zentralzylinder der Wurzel gebildet werden, entnehmen die Nematoden ihre Nahrung und schwellen dabei stark an. Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) verbleiben ebenfalls an der
45 einmal gewählten Parasitierungsstelle und veranlassen die Bildung von Nährzellen, welche aber, anders als bei den Zystenbildenden Nematoden aus mehreren, durch synchrone Kernteilungen ohne Zell-

wandbildung sich entwickelnden vielkernigen Riesenzellen bestehen (Fenoll and Del Campo (1998) *Physiol. Mol. Biol. Plants* 4:9-18). Die Bildung der Nährzellensysteme wird durch die Signalmoleküle im Speichel der Nematoden induziert. Es ist bekannt, dass während dieser Differenzierungsprozesse eine Reihe von Pflanzengen
5 ihr Expressionsprofil stark verändern. In der Literatur sind Promotoren beschrieben, die speziell in Nährzellsystem (Syncytien) induziert werden. Beispielfhaft seien zu nennen der $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) *Science* 263:221-223,
10 der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Ecobar et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12: 440-449), sowie Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832).

WO 94/10320 beschreibt DNA Konstrukte zur Expression von Genen,
15 die als Inhibitoren endogener Pflanzengene wirken (z.B. ATP Synthase, Cytochrom C, Pyruvatkinase), unter der Kontrolle von Nematoden-induzierter Promotoren in den Syncytien.

Trotz einiger Fortschritte in manchen Bereichen der Pflanzen-
20 biotechnologie, sind die Erfolge beim Erzielen einer Pathogen-resistenz in Pflanzen sehr begrenzt und bislang nur gegen Viren hinreichend belegt. Insbesondere Ernteverluste infolge von Pilz- und Nematodenbefall stellen ein ernstzunehmendes Problem dar und erfordern nach wie vor den intensiven Einsatz von Fungiziden und
25 Nematoziden. Dennoch sind die damit zusammenhängenden Probleme nur unzureichend in den Griff zu bekommen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Ver-
fahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine
30 effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrums von Pathogenen, bevorzugt von Pilzen und Nematoden, in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

35 Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

40

- a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und

45

5.

- b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle pflanzlichen Organismen angewendet werden, die Saccharose produzieren. Dazu zählen alle höheren Pflanzen. Es wurde überraschender Weise beobachtet, dass auf Kartoffelscheiben transgener Kartoffelpflanzen, in deren Knollen aufgrund transgener Expression einer
- 10 Saccharoseisomerase Saccharose in Palatinose umgewandelt wird, das Wachstum des Pilzes *Alternaria* signifikant gehemmt ist.

Ferner kann beobachtet werden, dass die transgene Expression der Saccharoseisomerase auch eine Resistenz gegen Nematoden bewirkt.

- 15 Insbesondere eine durch endoparasitären Wurzelnematoden hervorgerufene Syncytien-spezifische Expression der Saccharoseisomerase-Sequenz bewirkt eine deutliche Reduktion des Nematodenbefalls.

- Da zahlreiche Pathogene, insbesondere Pilze und Nematoden, Palatinose nicht verstoffwechseln können, ist eine Überwindung der Resistenz durch einfache Mutation in den Pathogenen kaum möglich, da hierfür die Gewinnung einer neuen Enzymaktivität erforderlich wäre.
- 20

- 25 "Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität" meint im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Protein, das als "wesentliche Eigenschaft" die Isomerisierung von Saccharose zu anderen Disacchariden katalysiert, wobei die $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zwischen Glukose und Fruktose in der Saccharose in eine andere
- 30 glykosidische Bindung zwischen zwei Monosaccharideinheiten überführt wird, insbesondere in eine $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung und/oder einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung.

- Eine Saccharoseisomerase-Aktivität kann indirekt über die
- 35 Analyse der resultierenden Kohlenhydrate (z.B. Palatinosegehalt) in der dem Fachmann geläufigen Weise beispielsweise durch Analyse ethanolischer Extrakte entsprechenden biologischen Materials (z.B. Material einer transgenen Pflanze oder eines Mikroorganismus) gemessen werden. Besagte Extrakte können z.B.
- 40 durch HPLC analysiert und die Zucker anhand der entsprechenden Standards identifiziert werden. Ein Verfahren zur Analyse ist z.B. in WO 01/59136 beschrieben. So werden zum Nachweis von Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzenextrakten Blattscheiben mit einem Durchmesser von ca. 0,8 cm für 2 h bei 70°C mit 100 μ l
- 45 80 % Ethanol und 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) extrahiert. Für die Analyse eines Aliquots dieser Extrakte kann ein HPLC-System z.B. der Firma Dionex verwendet werden, welches mit einer PA-1 (4 x

250 mm)-Säule und einen gepulsten elektrochemischen Detektor ausgestattet werden kann. Vor der Injektion können die Proben für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert werden. Die Zucker können anschließend mit einem 10 minütigen Gradienten von 0 bis 1 M Natriumacetat nach 4 Minuten bei 150 mM NaOH und einer Durchflussrate von 1 ml/min eluiert werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Zucker können die entsprechenden Standards der Firma Sigma verwendet werden.

- 10 Besonders bevorzugt wird unter einem Protein mit Saccharose-isomerase Aktivität ein Protein verstanden, das als wesentliche Eigenschaft zur Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose und/oder Trehalulose befähigt ist. Dabei beträgt der Anteil von Palatinose und Trehalulose an den gesamten Disacchariden, die
- 15 durch Isomerisierung von Saccharose gebildet werden mindestens 2 %, bevorzugt mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 %.

- Die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharose-isomerase-Aktivität, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder
- 20 nach herkömmlichen Verfahren synthetisiert werden.

- Beispiele für Organismen, deren Zellen Proteine mit Saccharose-isomerase-Aktivität sowie die dafür kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, sind insbesondere Mikroorganismen der
- 25 Gattungen *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* und *Enterobacter*. Insbesondere sind hier folgende Beispiele für solche Mikroorganismen zu nennen:

- 30 *Protaminobacter rubrum* (CBS 547, 77), *Erwinia rhapontici* (NCPFB 1578), *Serratia plymuthica* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285), *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-52 If (ATCC 1083 0a), *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619), *Agrobacterium radiobacter* MX-232 (FERM 12397 bzw. FERM BP
- 35 3620), *Klebsiella* subspezies und *Enterobacter* spezies.

- In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharose-isomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine
- 40 mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- i) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein gemäß
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und

- ii) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36 und
- iii) Nukleinsäuresequenzen kodierend für funktionell äquivalente Fragmente zu einem Protein gemäß i) und ii).

- Weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, sind im Stand der Technik bekannt und stehen dem Fachmann somit für den Transfer auf Pflanzenzellen zur Verfügung. So sind z.B. Sequenzen aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter species* SZ 62 und *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 in WO 95/20047 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen, sowohl hinsichtlich der offenbarten Sequenzen selbst, als auch im Hinblick auf die Auffindung und Charakterisierung dieser und weiterer Saccharoseisomerase kodierender Sequenzen aus anderen Quellen.
- 20 Weitere für Saccharoseisomerasen kodierende DNA-Sequenzen kann der Fachmann u.a. den Gendatenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Durchmustern nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Saccharoseisomerase kodierende
 - 25 Nukleinsäuresequenzen aus anderen Organismen mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann z.B. geeignete Hybridisierungs-sonden von den bekannten Saccharoseisomerase-Sequenzen ableiten und für das Durchmustern
 - 30 von cDNA-und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, aus dem ein neues Saccharoseisomerase-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen (siehe z.B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Ebenso ist der Fachmann in der Lage, anhand bekannter Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen geeignete - gegebenenfalls degenerierte - Oligonukleotide als Primer für Klonierungen neuer Gene mittels PCR zu synthetisieren
 - 35 und erfolgreich einzusetzen.

- Proteine mit Saccharoseisomerase Aktivität sowie die dafür kodierenden Nukleinsäuresequenzen kann der Fachmann in der ihm geläufigen Weise unschwer aus solchen Organismen isolieren, in denen solche Aktivitäten detektiert wurden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (z.B. DE 44 14 185). So kann z.B. durch partiellen Verdau von genomischer DNA eines solchen Organismus
- 45

(bevorzugt eines Mikroorganismus) und Einbringen der erhaltenen Fragmente in geeignete E.coli-Vektoren und Transformation einer Genbank gewonnen werden, deren Klone genomische Abschnitte zwischen 2 und 15 kb des Spenderorganismus enthalten. Aus E.coli-
5 Zellen, die diese Plasmide tragen, werden durch Plattierung auf McConkey-Palatinosemedium solche ausgewählt, die eine Rotfärbung der Kolonie aufweisen. Die in diesen Zellen enthaltene Plasmid-DNA wird in eine E.coli-Mutante überführt, die auf Galactose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann (z.B. ED 8654, Sambrook
10 et al., supra, Seiten A9-A13). Diese transformierte Zelllinie ist zur Identifikation von Palatinoseproduzenten in der wie oben beschrieben hergestellten Genbank aus DNA des Spenderorganismus in der Lage. Zur Identifikation der gesuchten Palatinose-bildenden Klone werden die Zellen der Genbank
15 auf Minimal-Salzmedien mit Galactose und Saccharose vereinzelt und angezogen. Nach Replika-Stempeln der Kolonien auf Platten mit dem gleichen Medium werden die Zellen durch Bedampfung mit Toluol abgetötet. Anschließend werden Zellen des Screeningstamms als Rasen in Minimalsalz-Weichagar ohne C-Quellenzusatz über
20 die Kolonien der Genbank ausgebracht und bebrütet. Es entsteht signifikantes Wachstum der Zellen des Screeningstamms nur am Ort von Zellen der Genbank, die Palatinose produziert haben. Bei Prüfung der Zellen der Replikakontrolle ergibt sich der Gehalt an Isomerase. Diese so identifizierten E.coli-Klone sind
25 auf Palatinose als einziger C-Quelle im Medium nicht wachstumsfähig, zeigen im Test der ganzen Zellen oder in Zellextrakten keine Fähigkeit zur Spaltung von Saccharose, bilden aber unter diesen Bedingungen und ohne Zusatz von Saccharose zum Medium bei der Anzucht Palatinose.

30 Alternativ können Isomerase-Klone auch unter Verwendung eines PCR-Fragments identifiziert werden. Verwendet man Plasmid-DNA den so identifizierten E.coli-Klonen als Sonden zur Hybridisierung an Filtern mit immobilisierter DNA aus dem
35 Spenderorganismus, lassen sich die Genbereiche, die Isomerase-gene tragen, nachweisen und gezielt verfügbar machen.

Funktionelle Äquivalente der im Rahmen dieser Erfindung offenbarten Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität umfassen
40 bevorzugt solche aus anderen Organismen, beispielsweise aus Mikroorganismen, deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium, Klebsiella und Enterobacter. Diese können z.B.
45 durch Datenbanksuche in Sequenzdatenbanken wie GenBank oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Banken - z.B. unter Verwendung der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder eines Teils derselben als

Suchsequenz bzw. Sonde - aufgefunden werden. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

- 5 So kann der Fachmann, falls erwünscht, zusätzlich mittels Routinetechniken, verschiedenartige Mutationen in die die Saccharoseisomerase kodierende DNA-Sequenz einführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. So ist es z.B. möglich, gezielt
- 10 Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind in der Literatur beschrieben und dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Braun et al. (1992) EMBO J 11:3219-3227; Wolter F et al. (1988) Proc Natl Acad
- 15 Sci USA 85:846-850; Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1:95-106).

Weiterhin ist auch die Einführung von Punktmutationen an Positionen denkbar, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielsweise auf die Enzymaktivität

- 20 oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr den normalerweise in der Zelle herrschenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen. Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat-
- 25 oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-, Temperatur- und/oder pH-Profil aufweisen.

Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a.

- 30 die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codonpräferenz ("codon usage") der Zielpflanze, also der aufgrund der Expression der Saccharoseisomerase-Nukleinsäuresequenz pathogenresistenten Pflanze bzw. Pflanzenzelle, anzupassen und die Expression dadurch zu optimieren.

35

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-

- 40 Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al. (1989), vide supra) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente - wo erforderlich - Adapter oder Linker angefügt
- 45 werden. Ferner können mittels enzymatischer und anderer Manipulationen passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung gestellt oder überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen

entfernt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse und
5 weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt
10 mindestens 90 % zu einer der Polypeptidsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 60 Aminosäuren besonders bevorzugt mindestens 90 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge eines
15 der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver-
20 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

25 Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von
30 mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

35 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu einer der Nukleinsäuresequenzen mit der SEQ ID NO: 1, 3,
40 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 haben. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 100 Basen, bevorzugt mindestens 200 Basen besonders bevorzugt mindestens 300 Basen, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35.

45

11

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die jeweilige Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, 5 University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

10

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

- Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz 15 SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.
- 20 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vor- 25 genannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Saacharoseisomerase aufweisen.
- "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungs- 30 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 35 6.3.1-6.3.6.) beschrieben.

- Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und 40 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben 45 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.

12

Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung 5 und Waschschrift sind infolge gegeben:

- (1) Hybridisierungsbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:
- 10 a) 4X SSC bei 65°C,
 - b) 6X SSC bei 45°C,
 - c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
 - f) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C,
 - 15 h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
 - i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).
- (2) Waschschriffe können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:
- 20 a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
 - b) 0,1X SSC bei 65°C.
 - c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
 - 25 d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
 - e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
 - f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäuresesequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharoseisomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodierend, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- 35 a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36, und
- b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von mindestens 40 % zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 36 aufweisen, und
- 40 c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35, und

13

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresesequenz von
c) degeneriert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40 %
5 zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9,
11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang
der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
10 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren,

sowie funktionell äquivalenten Fragmenten der vorgenannten.

Funktionell äquivalente Fragmente meint in Bezug auf ein Protein
15 mit Saccharoseisomerase-Aktivität bzw. eine Nukleinsäuresequenz
kodierend für eine solche, all solche Polypeptide bzw. für diese
kodierenden Nukleinsäuresesequenz, die gegenüber ihrer Ausgangs-
sequenz eine Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende und/oder eine
oder mehrere Deletionen aufweisen, aber nach wie vor über eine
20 Saccharoseisomerase-Aktivität verfügen, bzw. für ein Protein
mit derselben kodieren. Hierbei ist zum einen die Erzeugung
von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende
Deletion vom 5'- oder vom 3'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz
die Synthese entsprechend verkürzter Proteine erreicht werden
25 kann.

Wie oben erwähnt, können die kodierenden Sequenzen für Saccha-
roseisomerasen auch durch Signalsequenzen ergänzt sein, die für
den Transport des Genprodukts, also vorliegend des Proteins mit
30 Saccharoseisomerase-Aktivität, zu einem bestimmten Kompartiment
sorgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sorgen Signal-
sequenzen dafür, dass die Saccharoseisomerase in die Zellwand
35 bzw. den Apoplasten der transformierten Pflanzenzellen trans-
portiert wird, d.h. die transformierten Pflanzen exprimieren eine
chimäre Saccharoseisomerase, die ein Signalpeptid für den Trans-
port in das Endoplasmatische Retikulum umfasst. Geeignete Signal-
sequenzen, die die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum
40 gewährleisten, kann der Fachmann der einschlägigen Literatur
entnehmen. Besonders geeignet ist z.B. die für das Signalpeptid
des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus Kartoffel kodierende
Sequenz (Keil et al. (1996) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Gen-
bank Accession No. X04118). Andere geeignete Signalsequenzen
45 sorgen z.B. für die Aufnahme der Saccharoseisomerase in die
Vakuole. Hier ist als Beispiel das Signalpeptid des Patatin-Gens

aus Kartoffel (Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1(1):95-106) zu nennen.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von
5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung der Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel
10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten
15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine
20 erhöhte Resistenz gegen ein oder mehrere Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die
25 Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens
30 90 % oder 95 % vermindert.

"Auswahl" umfasst in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen
35 mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die
40 Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Pilze, pilzähnliche Pathogene (wie beispielsweise Chromista; z.B. Oomyceten) sowie tierische Schädlinge wie
45 beispielsweise Nematoden. Besonders bevorzugt sind Nematoden und Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Expression eines

Saccharoseisomerase-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende 5 Pathogene zu nennen:

1.. Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene:

Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) umfassen biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze und stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	Puccinia recondita
Gelbrost	P. striiformis
Echter Mehltau	Erysiphe graminis
Spelzenbräune	Septoria nodorum
Blattdürre	Septoria tritici
Ährenfusariosen	Fusarium spp.
Halmbruchkrankheit	Pseudocercospora herpotrichoides
Flugbrand	Ustilago spp.
Weizensteinbrand	Tilletia caries
Schwarzbeinigkeit	Gaeumannomyces graminis
Anthracnose leaf blight	Colletotrichum graminicola (teleomorph: Glomerella graminicola)
Anthracnose stalk rot	Politis); Glomerella tucumanensis (anamorph: Glomerella falcata Went)
Aspergillus ear and kernel rot	Aspergillus flavus
Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris)
Black bundle disease	Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda
Black kernel rot	Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
Borde blanco	Marasmiellus sp.

	Erkrankung	Pathogen
	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
5	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
10	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Cochliobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (teleomorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuberculata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
15	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
20	Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
25	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodia leaf macrospora

Tabelle 2: Falscher Mehltau (Oomyceten)

	Erkrankung	Pathogen
30	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zeae
	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
35	Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
	Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
40	Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
	Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
45	Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari

	Erkrankung	Pathogen
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)
5	Ear rots, minor	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = 10 Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydis, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, 15 Scopulariopsis brumptii
	Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
	Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
20	Fusarium ear and stalk rot	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
25	Fusarium stalk rot, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
	Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
30	Gray ear rot	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
35	Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
	Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
	Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
40	Late wilt	Cephalosporium maydis

	Erkrankung	Pathogen
5	Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victorae = Helminthosporium victorae (teleomorph: Cochliobolus victorae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
10		
15		
20	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
25	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystospora zeae
	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
30	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenochaeta stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
35	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
40	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae

	Erkrankung	Pathogen
5	Root rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cercospora sorghi</i> , <i>Dictyochoeta fertilis</i> , <i>Fusarium acuminatum</i> (teleomorph: <i>Gibberella acuminata</i>), <i>F. equiseti</i> (teleomorph: <i>G. intricans</i>), <i>F. oxysporum</i> , <i>F. pallidoroseum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. roseum</i> , <i>G. cyanogena</i> , (anamorph: <i>F. sulphureum</i>), <i>Microdochium bolleyi</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Periconia circinata</i> , <i>Phytophthora cactorum</i> , <i>P. drechsleri</i> , <i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i>
10	Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	<i>Setosphaeria rostrata</i> , (anamorph: <i>Exserohilum rostratum</i> = <i>Helminthosporium rostratum</i>)
15	Rust, common corn	<i>Puccinia sorghi</i>
	Rust, southern corn	<i>Puccinia polysora</i>
	Rust, tropical corn	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>
20	Sclerotium ear rot (southern blight)	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (teleomorph: <i>Athelia rolfsii</i>)
25	Seed rot-seedling blight	<i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>B. zeicola</i> = <i>Helminthosporium carbonum</i> , <i>Diplodia maydis</i> , <i>Exserohilum pedicellatum</i> , <i>Exserohilum turcicum</i> = <i>Helminthosporium turcicum</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Gibberella zeae</i> (anamorph: <i>F. graminearum</i>), <i>Macrophoma phaseolina</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. zeae</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Spicaria</i> sp.
30	Selenophoma leaf spot	<i>Selenophoma</i> sp.
	Sheath rot	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
	Shuck rot	<i>Myrothecium gramineum</i>
35	Silage mold	<i>Monascus purpureus</i> , <i>M. ruber</i>
	Smut, common	<i>Ustilago zeae</i> = <i>U. maydis</i>
	Smut, false	<i>Ustilaginoides virens</i>
	Smut, head	<i>Sphacelotheca reiliana</i> = <i>Sporisorium holcisorghi</i>
40	Southern corn leaf blight and stalk rot	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (anamorph: <i>Bipolaris maydis</i> = <i>Helminthosporium maydis</i>)
	Southern leaf spot	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia macrospora</i>

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinatum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
15	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. mancharica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gräsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschnitzel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

- mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Umicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia* *inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- 10
- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzelötter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).
- 20
- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).
- 30
- 35
- 40

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

45

Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotium (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), Septoria nodorum und 15 Septoria tritici (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Tierische Schädlinge

Bei den im Rahmen dieser Erfindung als zur Bekämpfung bevorzugten pflanzenschädigenden Nematoden sind folgende Gruppen beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - zu nennen:

15

- a) Freilebende, wandernde Wurzel-nematoden: (z.B. Pratylenchus, Xiphinema und Longidorus-Arten).

Wandernden Nematoden sind nicht an eine Parasitierungsstelle ge-
20 bunden, sondern können diese wechseln. Sie können von einer Wurzel zur anderen, von einer Pflanze zur anderen und zum Teil auch im Pflanzengewebe wandern. Lange Zeit hat man ihre Bedeutung als Schädlinge unterschätzt. Heute zählen sie zu den überaus gefährlichen pflanzenschädigenden Nematoden. Viele Wachstumsschäden
25 (auch sog. "Bodenmüdigkeit") und frühzeitiges Vergilben der Kulturpflanzen konnten auf derartige Wurzelschädlinge zurückgeführt werden. Vor allem Pratylenchus Arten sind auch im Zierpflanzenbau als Ursache heftiger Wurzelschäden bekannt. Erkrankte Wurzeln sind daran zu erkennen, dass sie stellenweise braune Verfärbungen
30 aufweisen. In die hervorgerufenen Wunden dringen nachträglich auch Fäulnisorganismen ein, die ein rasches Absterben des Gewebes und tiefgehende Fäulnis an diesen Stellen zur Folge haben. Wirtspflanzen sind unter anderen: div. Getreidearten, Erdäpfel, Karotten, Paradeiser, Gurken, Sellerie und Wein.

35

- b) Wurzelgallenerzeugende Nematoden (z.B. Meloidogyne- Arten)

Die Larven dieser Arten bohren sich meist nahe der Spitze in die Wurzeln ein und verursachen durch Ausscheidungen ihrer Speicheldrüsen Verdickungen (Gallen) des sie umgebenden Pflanzengewebes.
40 In diesen Gallen überdauern sie und gelangen entweder aktiv oder nach Zerfall der Gallen wieder in den Boden zurück. Die Störung im Stoffwechsel der Pflanze infolge des Schädlingsbefalls macht sich in mehr oder weniger kümmerlichem Wuchs und allgemeinem
45 Kränkeln der Pflanze bemerkbar. Wurzelgallenälchen zählen vor allem in Gewächshäusern zu den größten Schädlingen, wurden aber

auch im Freiland an Karotten, Sellerie und Petersilie nachgewiesen.

c) Nematoden als Schädlinge der Blütenanlagen: (*Anguina tritici*)

Das Weizenälchen ist ein spezialisierter Parasit der Blütenanlage des Weizens, die sie in Gallen umwandelt. Bereits im Jungstadium der Pflanze ist der Nematodenbefall an den Wellungen oder Kräuselungen der Blätter zu erkennen.

d) Zystenbildende Wurzel-nematoden: (Globodera- und Heterodera-Arten)

Das Kartoffelzystenälchen ist der Kartoffelfeind Nummer 1. Diese Art übertrifft hinsichtlich ihrer Schädlichkeit alle anderen Heterodera-Arten und kann bei massiven Ausbruch bis zu 80% der Ernte vernichten. Nach dem Befall mit zystenbildenden Nematoden kümmerst die Pflanze ohne äußerlich erkennbare Ursache. Erst wenn man die Wurzeln untersucht, erkennt man stecknadelkopfgroße, bräunlich, gelbe oder weißliche Zysten. Die weiblichen Nematoden bohren sich in die Wurzel und sprengen durch ihren mit Eiern gefüllten und dadurch anschwellenden Hinterleib die Wurzel. Der Nematode steckt mit seinem Mundstachel noch in der Wurzel, während der prall gefüllte Hinterleib im Erdreich liegt. Das Muttertier stirbt und seine sich verfestigende Haut wird zur Schutzhülle (Zyste) für die Eier und Larven. Die Zysten samt Inhalt sind sehr widerstandsfähig und können lange Zeit überdauern. Bei geeigneten Umweltbedingungen bohren sich die Larven ins Freie und befallen neue Wurzeln. Die wichtigsten zystenbildende Nematoden sind Kartoffel-, Rüben-, Hafer-, Erbsen-, Klee-, Kohl-, Hopfen-, Möhrenzystenälchen (Untersuchung auf Kartoffelzystennematoden siehe auch unter: <http://www.bfl.at/>)

Als tierische Schädlinge sind insbesondere Nematoden bevorzugt.

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 3: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. zeae, Punctodera chaltoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
10	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zeae
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
20	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

- 25 Ganz besonders bevorzugt sind Globodera rostochiensis und G. pallida (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), Heterodera schachtii (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), Heterodera avenae (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), Ditylenchus dipsaci
- 30 (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), Anguina tritici (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), Meloidogyne hapla (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).
- 35

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Pilzpathogene erzielt:

- 40 1. Gerste: Puccinia graminis f.sp. hordei (barley stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. hordei (Barley Powdery Mildew).
2. Sojabohne: Phytophthora megasperma fsp.glycinea, Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum,
- 45 Fusarium oxysporum, Diaporthe phaseolorum var. sojae (Phomopsis sojae), Diaporthe phaseolorum var. caulivora, Sclerotium

25

- rolfsii, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Microsphaera diffusa*,
5 *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, *Glomerella glycines*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium solani*.
3. Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria*
10 *maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.
4. Alfalfa: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium*
15 *ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichia medicaginis*, *Fusarium*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.
20
5. Weizen: *Urocystis agropyri*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*,
25 *Cephalosporium gramineum*, *Colletotrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*,
30 *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*,
35 *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew)
- 40 6. Sonnenblume: *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, Aster Yellows, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*,
45

Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo tragopogonis.

7. Mais: Fusarium moniliforme var. subglutinans, Fusarium
 5 moniliforme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum),
 Stenocarpella maydi (Diplodia maydis), Pythium irregulare,
 Pythium debaryanum, Pythium graminicola, Pythium splendens,
 Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Aspergillus
 flavus, Bipolaris maydis 0, T (Cochliobolus heterostrophus),
 10 Helminthosporium carbonum I, II & III (Cochliobolus
 carbonum), Exserohilum turcicum I, II & III, Helmintho-
 sporium pedicellatum, Physoderma maydis, Phyllosticta maydis,
 Kabatiella maydis, Cercospora sorghi, Ustilago maydis,
 Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macrophomina phaseolina,
 15 Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae, Cladosporium
 herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inaequalis,
 Curvularia pallescens, Trichoderma viride, Claviceps sorghi,
 Cornstunt spiroplasma, Diplodia macrospora, Sclerophthora
 macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora
 20 philippinesis, Peronosclerospora maydis, Peronosclerospora
 sacchari, Spacelotheca reiliana, Physopella zeae, Cephalo-
 sporium maydis, Caphalosporium acremonium.
8. Sorghum: Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola
 25 (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora
 sorghi, Ascochyta sorghina, Puccinia purpurea, Macrophomina
 phaseolina, Perconia circinata, Fusarium monilifonne, Alter-
 naria alternate, Bipolaris sorghicola, Helminthosporium
 sorghicola, Curvularia lunata, Phoma insidiosa, Ramulispora
 30 sorghi, Ramulispora sorghicola, Phyllachara sacchari,
 Sporisorium reilianum (Sphacelotheca reiliana), Sphacelotheca
 cruenta, Sporisorium sorghi, Claviceps sorghi, Rhizoctonia
 solani, Acremonium strictum, Sclerophthona macrospora,
 Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis,
 35 Sclerospora graminicola, Fusarium graminearum, Fusarium
 oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz
 gegen nachfolgende beispielhaft genannte Nematodenpathogene
 40 erzielt:

Zucker- rübe	Zuckerrübenzystenälchen (Sugar beet cyst nematode)	Heterodera schachtii
45 Kartoffel	Columbia Wurzelgal- lenälchen (Columbia Root- knot Nematode)	Meloidogyne chitwoodi
	Golden Nematode	Globodera rostochiensis

	Nördliches Wurzelgal- lenälchen (Northern Root Knot Nema- tode)	Meloidogyne hapla
5	Potato Rot Nematode	Ditylenchus destructor
	Sojabohne Sojabohnenezystenälchen (Soybean cyst nematode; SCN)	Heterodera glycines
	Mais Maiszystenälchen (Corn Cyst Nematode)	Heterodera zeae
10	Wurzelgallenälchen (Root-Knot Nematodes)	Meloidogyne species: Meloidogyne arenaria Meloidogyne graminicola Meloidogyne chitwoodi Meloidogyne hapla Meloidogyne incognita Meloidogyne javanica
15		

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährigen, monocotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus,

Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, 5 Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranth- 10 aceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubi- aceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanacea, Sterculiaceae, Tetragoniaceae, Theaceae, Umbelliferae.

15 Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr 20 sowie alle Arten von Gräsern.

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, 25 wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- 30 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie 35 (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,
- 40 - Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise *Coffea arabica* oder *Coffea liberica* (Kaffeestrauch) und andere mehr,
- 5 - Solanaceae besonders die Gattung *Lycopersicon*, ganz besonders die Art *esculentum* (Tomate), die Gattung *Solanum*, ganz besonders die Art *tuberosum* (Kartoffel) und *melongena* (Aubergine), und die Gattung *Capsicum*, ganz besonders die Art *annuum* (Paprika) sowie Tabak und andere mehr,
- 10 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Theobroma cacao* (Kakaostrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Camellia sinensis* oder *Thea sinensis* (Teestrauch) und andere mehr,
- 15 - Umbelliferae, besonders die Gattung *Daucus* (ganz besonders die Art *carota* (Karotte)) und *Apium* (ganz besonders die Art *graveolens dulce* (Selderie)) und andere mehr,
- 20 sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- 25 Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose);
- 30 Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetales, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das
- 35 Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.
- 40 Am meisten bevorzugt sind landwirtschaftliche Nutzpflanzen, die von Natur aus einen hohen Anteil an Saccharose aufweisen oder deren Wurzeln, Knollen oder Speicherwurzeln wirtschaftlich verwertet werden, wie z.B. Kartoffel, Rübe oder Zuckerrübe.
- 45 Ebenfalls bevorzugt sind Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja sowie Getreidearten wie Hafer,

Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais. Am meisten bevorzugt sind Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe und Zuckerrohr.

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen Expressionskonstrukte
- 5 zur Expression von Proteinen mit Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzen zum Einsatz. Derartige Expressionskassetten sind beispielsweise in WO 01/59136 und WO 01/59135 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.
- 10 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit Saccharoisomerase-Aktivität (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder eines funktionellen Äquivalentes desselben oder eines funktionell äquivalenten Teils der vorgenannten) bevorzugt in funktioneller Verknüpfung
- 15 mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine transgene Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben gewährleistet.
- 20 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regula-
- 25 tiven Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar
- 30 von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind.
- 35 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J
- 40 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing
- 45 Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden,

die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen, einer att-Sequenz für Rekombinasen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das transgene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom inseriert werden.

10

Unter einem Expressionskonstrukt sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für das Proteins mit Saccharoisomerase-Aktivität (z.B. kodiert durch SEQ ID NO: 2 oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Teil der vorgenannten) - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - so hinter einen endogenen pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die transgene Expression der besagten Nukleinsäuresequenz gewährleistet.

20

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe oder Organ, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In Bezug auf die zu transformierende Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Bevorzugt sind:

30

a) Konstitutive Promotoren

35

"Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor

40

45

ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus *Agrobacterium*, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689; Bruce et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter-einheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus *A. thaliana* (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) *Gene* 170:197-200).

b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Blätter, Stengel, Wurzeln oder Samen.

Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) *Plant Cell* 1(9):839-53; z.B. aus *Phaseolus vulgaris*; van der Geest et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32:579-588), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) *J Biol Chem* 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) *Mol Gen Genet* 225(3):459-467; Phillips et al. (1997) *EMBO J* 16:4489-4496), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) *L Planta* 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), der Hordein-Promotor (Brandt et al. (1985) *Carlsberg Res. Commun.* 50:333-345) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) *Mol Gen Genet* 225:121-128; Bäumlein H et al. (1992) *Plant J* 2(2):233-239; Fiedler U et al. (1995) *Biotechnology (NY)* 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus *Brassica* (WO 91/13980).

Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase), der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, der Promotor der Stärkesynthase oder anderer Stärke bildender/modifizierender Enzyme wie z.B. Promotoren von Genen die für Verzweigungsenzyme

- 5 kodieren (WO 92/14827, WO 92/11375). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.
- 10
- 15 - Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
- 20 Besonders bevorzugt ist dabei der B33-Promotor des Klasse I Patatin-Gens aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29). Der Promotor des Klasse I Patatin-Gens ist in Knollen ca. 100 bis 1000 mal aktiver als in Blättern (Rocha-Sosa et al., vide supra). Weitere Gene mit knollenspezifischer oder zumindest in Knollen verstärkter Expression sind bekannt (z.B. der Promotor der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase-Gene; Müller et al. (1990) Mol Gen Genet 224:136-146).
- 25
- 30 - Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase; US 4,962,028) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol Biol 36:101-112).
- 35
- c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die transgenen Expressionskonstrukte können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J

40

45

2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

5

d) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Frucht-reifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der
10 Fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

15 e) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al.
20 (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPK Promotor.

25 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes et al.
30 (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics
35 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

40 Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498; EP-A 375 091), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des
45 Systemin Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76),

des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

5 Besonders bevorzugt sind Promotoren, die speziell in Nährzellsystemen (Syncytien) nach Nematodenbefall induziert werden. Beispielfhaft seien zu nennen

- 10 i) der $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) Science 263: 221-223), insbesondere der durch SEQ ID NO: 24 beschriebene Promotor,
- 15 ii) der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449), insbesondere der durch SEQ ID NO: 23 beschriebene Promotor, sowie
- iii) Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832), insbesondere die durch SEQ ID NO: 32, 33 oder 34 beschriebenen Promotoren.

20 Weitere im Rahmen dieser Erfindung bevorzugte nematoden-induzierbare Promotoren sind in WO 98/22599 beschrieben. Insbesondere bevorzugt sind dabei die regulatorischen Bereiche (d.h. die dem ATG-Startkodon vorgelagerten Bereiche) der Sequenzen mit den GenBank Acc.-No.: A91914 (Basenpaare 1 bis 3480). Ferner bevorzugt
25 sind die in US 6,395,963 beschriebenen Promotorsequenzen, die in WO 03/033651 beschriebenen Promotorsequenzen, die in JP 2001508661-A beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Sequenz mit den GenBank Acc.-No.: BD056958), sowie die in WO 97/46692 beschriebenen Promotorsequenzen (insbesondere die Se-
30 quenz mit den GenBank Acc.-No.: A79355; Basenpaare 1 bis 2127, oder 1 bis 2160). Weitere nematoden-induzierbare Promotoren können von Genen abgeleitet werden, deren Induktion infolge eines Nematodenbefalls beschrieben ist. Beispielfhaft - jedoch nicht einschränkend - sind zu nennen: Der Pollenin Promotor (Karimi M
35 et al. (2002) J Nematol 34(2):75-79) sowie der Promotor einer putativen Rezeptor Serin/Threonin Proteinkinase (Custers JHHV et al. (2002) Mol Plant Pathol 3(4):239-249).

Besonders bevorzugt sind pathogen- oder stress-induzierbare,
40 sowie Samen-, Knolle-, Wurzel-, Blatt- und/oder Stengel-spezifische, wobei pathogen-induzierbare (insbesondere die oben spezifisch genannten nematoden-induzierbaren Promotoren) am meisten bevorzugt sind.

45 Ein weiterer - besonders bevorzugter - Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, in denen eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität in

funktioneller Verknüpfung mit einem stress-, pathogen-, oder verwundungs-induzierbaren Promotor steht. Stress-, pathogen oder verwundungs-induzierbare Promotoren meint allgemein all solche Promotoren, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden können. Abiotischer Stress meint dabei Stimuli wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Frost, Feuchte, Salz, UV-Licht usw. Biotischer Stress meint dabei den Befall durch ein Pathogen, wobei der Begriff "Pathogen" all die oben genannten Pathogene umfasst. Dabei hat der Stimulus bevorzugt eine Stärke, die zu einem Ertragsrückgang von mindestens 5 % im Vergleich zu durchschnittlichen Ertragswerten führt. Induzierbar meint dabei eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität um mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 100 %, besonders bevorzugt mindestens 500 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 %, am meisten bevorzugt mindestens 5000 % im Vergleich zu der Expressionsaktivität einer nicht-stimulierten Pflanze. Stress- oder pathogen-induzierbare Promotoren umfassen beispielhaft, jedoch nicht einschränkend den pathogen-induzierbaren Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), den hitzeinduzierbaren hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), den kälteinduzierbaren α -Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), den licht-induzierbaren PPK Promotor oder den verwundungs-induzierbaren pinII-Promoter (EP-A 0 375 091). Bevorzugt sind insbesondere pathogen-induzierbare Promotoren wie z.B. die Promotoren der PR-Proteine, SAR-Proteine, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968). Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1- und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen. Verwundungs-induzierbare Promotoren sind bei Befall durch Fraßpathogene vorteilhaft einzusetzen.

Der Durchschnittsfachmann kann darüber hinaus ohne weiteres zusätzliche Beispiele für Gene mit stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierten Expressionsmustern der Literatur entnehmen. Ferner ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, 5 mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien entsprechende regulatorische Nukleinsäurelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten 10 Schritt eine differentielle Expressionsbibliothek von beispielsweise pathogen-infizierten/befallenen und "normalem" Geweben angelegt. Anschließend werden mit Hilfe der so identifizierten pathogen-induzierten cDNAs Promotoren isoliert, die über pathogen-induzierbare regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann 15 stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierter Promotoren zur Verfügung.

Besonders bevorzugt sind gewebespezifische Promotoren, 20 insbesondere samenspezifische, knollenspezifische, fruchtspezifische und blattspezifische Promotoren sowie pathogen-induzierte Promotoren. Ganz besonders bevorzugt sind pathogeninduzierte Promotoren, insbesondere Nematoden-induzierte Promotoren.

25 Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel E.coli Bakterien 30 ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den Expressionskonstrukten oder Expressionsvektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen 35 Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion eines Expressionskonstruktes haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum 40 Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die Expressionskonstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzenspezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz 45 als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls

weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, 5 Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressions-
steuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch
genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische
Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren
erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasser-
10 stress, Abscisisäure (Lam E und Chua NH (1991) J Biol Chem
266(26):17131- 17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989)
Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untrans-
15 latierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von
Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S
Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116,
Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist
gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei
20 der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde
gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente
Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielfhaft
für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem
Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids
25 Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebes-
pezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine
oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell ver-
30 knüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene
Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende
der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können
zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie
weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die trans-
35 gen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer
oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind
pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche,
40 die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus Agro-
bacterium tumefaciens umfassen. Beispiele für besonders geeignete
Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator
und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator.

45 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die
eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines
Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom

erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine Saccharoseisomerase kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden.

5

Ein transgenes Expressionskonstrukt und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss

10 auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben. Beispielfhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

15 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide z.B. Metabolismusinhibitoren (wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika (wie z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin) oder Herbizide (wie Gyphosat oder Phosphinotricin) verleihen.

20

Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielfhaft seien

genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren

25 inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine

30 Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Anti-

biotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphospho-

35 transferase (spt) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (nptII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticin (G418) verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (hpt) Gen, das eine Resistenz

gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen

40 (als), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine
45 kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders

bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), Chloramphenicoltransferase, Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun. 126(3):1259-1268), β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

10

c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielfhaft als ORI ("origin of DNA replication") seien genannt der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

15

d) Elemente, die für eine Agrobakterium-vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

20

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

25

30

Die Einführung eines erfindungsgemäßen Expressionskonstruktes in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskonstrukte enthalten sind. Vektoren können beispielsweise Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Das transgene Expressionskonstrukt kann in den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle oder eine Rekombinase att-Sequenz eingeführt werden. Der entstandene transgene Expressionsvektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit den dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind

40

45

solche Vektoren, die eine stabile Integration des transgenen Expressionskonstruktes in das pflanzliche Genom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid et al. (1991) *Mol Gen Genet* 228:104-112; Guerche et al. (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhauser et al. (1987) *Theor Appl Genet* 75:30-36; Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73; Howell et al. (1980) *Science* 208:1265; Horsch et al. (1985) *Science* 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind bei-

spielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985). Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist das transgene Expressions-
5 konstrukt in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in
einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector)
oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur
Transformation verwendet, ist zumindest die rechte Begrenzung,
meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder
10 Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit dem einzuführenden
transgenen Expressionskonstrukt verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren
können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren.
15 Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen für die
Selektion transformierter Pflanzen (z.B. das nptII Gen, das eine
Resistenz gegen Kanamycin verleiht) und einen Linker oder Poly-
linker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungs-
sequenz. Außerhalb der T-DNA-Begrenzungssequenz enthalten sie
20 zudem noch einen Selektionsmarker, der eine Selektion trans-
formierter E.coli und/oder Agrobakteria ermöglicht (z.B. das
nptIII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht). Ent-
sprechende Vektoren können direkt in Agrobacterium transformiert
werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187).

25 Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium
sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese
ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle
erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur
30 Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Ver-
wendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist
intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In:
The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanthers B.V.,
Alblasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287).
35 Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommer-
ziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech
Laboratories, Inc. USA).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organis-
40 mus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation
von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen werden keine besonderen
Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache
Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen
vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert
45 werden, so ist es vorteilhaft, wenn sich auf dem Plasmid ein
zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

43

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker

5 kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines ent-

10 sprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin

15 verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in

20 üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in

25 Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225. Vorzugsweise wird das Expressionskonstrukt in einen Vektor kloniert,

30 der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann

35 eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt

40 und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992)

45 Plant Cell Rep. 11:567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep.

14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

"Transgen" meint alle solche Konstruktionen und Verfahren,
5 in denen sich entweder

- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität, oder
 - 10 b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
 - c) (a) und (b)
- 15 sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer
- 20 Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek.

25

30

35

40

45

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*
rhapontici (N-terminales Fragment)
4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*
rhapontici (N-terminales Fragment)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Erwinia rhapontici*
6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Erwinia rhapontici*
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Serratia plymuthica*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus *Serratia plymuthica*
13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für Fusions-
protein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia*
rhapontici (*palI*) und Signalpeptidesequenz des
Proteinase Inhibitor II Gens

14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici* (palI) und Signalpeptidesequenz des Proteinase Inhibitor II Gens
- 5
15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz (vollständige cDNA mit untranslatierter Region) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 10
16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 15
17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz (offenes Leseraster) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 20
18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus *Klebsiella* sp. LX3
- 25
19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)
- 30
20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)
- 35
21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)
- 40
22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)
- 45
23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicum esculatum*)
24. SEQ ID NO: 24 Nukleinsäuresequenz kodierend für Δ0.3TobRB7 Promotorsequenz (Region: -298 bis +76) aus *Nicotiana tabacum*

47

25. SEQ ID NO: 25 Oligonukleotidprimer FB83
5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3'
26. SEQ ID NO: 26 Oligonukleotidprimer FB84
5'-GTCGACGTCTTGCCAAAAACCTT-3'
27. SEQ ID NO: 27 Oligonukleotidprimer FB 97
5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3'
28. SEQ ID NO: 28 Oligonukleotidprimer Lem1
5'-atcGAATTCATAATTTAACCATCTAGAG-3'
29. SEQ ID NO: 29 Oligonukleotidprimer Lem2
5'-atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG-3'
30. SEQ ID NO: 30 Oligonukleotidprimer Tob1
5'-GGAATTCAGCTTATCTAAACAAAGTTTAAATTC-3'
31. SEQ ID NO: 31 Oligonukleotidprimer Tob2
5'-GGGTACCAGTTCTCACTAGAAAAATGCCCC-3'
32. SEQ ID NO: 32 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Wheat Dwarf Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006849; Sequenz 1 aus WO 00/01832)
33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Maize Streak Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006850; Sequenz 2 aus WO 00/01832)
34. SEQ ID NO: 34 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Pepper huasteco Virus (GenBank
Acc.-No.: AX006851; Sequenz 3 aus WO 00/01832)
35. SEQ ID NO: 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Serratia plymuthica
36. SEQ ID NO: 36 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-
isomerase aus Serratia plymuthica

40

45

Abbildungen

1. Fig. 1: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 - 5 35S: 35S Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) Promotor
 - SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
 - pall: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
 - OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 - EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 - 10 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
2. Fig 2: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pB33-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
 - 15 B33: Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33
 - SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
 - pall: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
 - OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
 - EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
 - 20 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
3. Fig. 3: Westernblot-Analyse von pall exprimierenden Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien. Pro Spur wurden 20 µg lösliches Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen, getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Filter wurden anschließend mit einem polyklonalen Pall Antikörper hybridisiert. Verglichen wurde die Expression in Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen (wt) mit der in den Kartoffellinien 5, 12, 26 und 33.
 - 25
 - 30
4. Fig. 4: HPLC-Analyse der löslichen Kohlenhydrate in Saccharoseisomerase exprimierenden Pflanzen.
 - A: Zuckerstandards.
 - B: Extrakt einer transgenen Knolle.
 - C: Extrakt einer Wildtypknolle.
 - 35
5. Fig. 5: Gehalt an Palatinose, Saccharose, Glucose und Stärke in Wildtyp-Kartoffelknollen (wt) und Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien (3 bis 37), die das chimäre pall Gen in der Zellwand exprimieren. Die Werte des Wildtyps (wt; gestreifte Säulen) und der transgenen Kartoffelknollen (3 bis 37; schwarze Säulen) entsprechen den Mittelwerten von vier Messungen ± Standardabweichung. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine transgene jedoch pall nicht-exprimierende Linie (Control) analysiert.
 - 40
 - 45

6. Fig. 6: Infektion von Kartoffelknollen mit *Alternaria solani*. Kartoffelscheiben von Wildtyp-Knollen und Knollen der pall exprimierenden transgene Linien 5 und 33 zum Zeitpunkt 14 Tage nach Infektion mit *Alternaria solani*.
- 5 A: Kontrolle mit Kartoffelscheiben von Wildtyp (wt)- und transgenen Knollen (Linien 5 und 33) nach 14-tägiger Inkubation ohne vorherige *Alternaria* Infektion.
- B: Wildtypknollen; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
- C: Transgene Linie-5; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
- 10 D: Transgene Linie-33; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion
7. Fig. 7: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pLemmi9-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
Lemmi9: Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*)
- 15 SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
pall: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
- 20 8. Fig 8: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pΔ0.3TobRB7-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
Δ0.3TobRB: Δ0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
- 25 pall: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

30 Beispiele

Allgemeine Methoden:

- Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise,
- 35 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte - wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren
- 40 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA - werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.
- 45 Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Hofgen und Willmitzer ((1988) Nucl. Acids Res. 16:9877) ausgeführt. Die Anzucht der *Agrobacterien* erfolgte

in YEB Medium (Vervliet et al. (1975) Gen Virol 26:33). Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Löcor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467)..

Beispiel 1: PCR-Amplifikation eines Subfragments der Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici*

- 10 Die Klonierung eines Subfragments der Saccharoseisomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische DNA aus *E. rhapontici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nach-
- 15 folgenden spezifischen Primer, die von einer Saccharoseisomerase-Sequenz des Standes der Technik abgeleitet wurden:

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB84 5'-GTCGACGTCTTGCCAAAACCTT-3' (SEQ ID NO: 26)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB84 die Basen 1289 bis 1306 der kodierenden Region des Saccharoseisomerase-Gens von *E. rhapontici*.

25

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

- chromosomale Bakterien DNA (1 µg)
- Primer FB 83 und FB 84 (jeweils 250 ng),
- 30 - Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

- Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min
- 35 auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt
- 40 (Invitrogen) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert.

- Das amplifizierte Subfragment kann auch als Hybridisierungssonde für die Isolierung weiterer Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen
- 45 aus anderen Organismen oder als Sonde bei der Analyse transgener Zellen und Pflanzen eingesetzt werden.

51

Beispiel 2: PCR-Amplifikation einer Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici*

Unter Verwendung des in Beispiel 1 amplifizierten Fragmentes wurde eine genomische Bank von *Erwinia rhapontici* nach Standardmethoden durchmustert. Anschließende Sequenzanalysen erlaubten die Bestimmung des offenen Leserahmens der Saccharoseisomerase. Von dieser Sequenz wurden die Oligonukleotidprimer FB83 und FB97 abgeleitet.

10

Die Klonierung des vollständigen offenen Leserasters der Saccharose-Isomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische DNA aus *E. rhapontici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nachfolgenden spezifischen Primer

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB97 5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3' (SEQ ID NO: 27)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB97 die Basen 1786 bis 1803 der kodierenden Region des Saccharoseisomerase-Gens. Zur Klonierung der amplifizierten DNA in Expressionsvektoren tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer FB 83, BamHI und Primer FB 97, SalI.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomale Bakterien-DNA (1 µg),
- Primer FB83 und FB97 jeweils 250 ng,
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 35 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das amplifizierte Saccharoseisomerase-Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt (Invitrogen) kloniert, wodurch das Plasmid pCR-SucIso2 (ohne Translationsstart) erhalten wurde. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Das PCR-Fragment beinhaltet somit die Sequenz einer

Saccharoseisomerase aus *E. rhapontici*, die sich von Nukleotid 109-1803 des Saccharoseisomerase-Gens erstreckt.

Beispiel 3: Herstellung von Plasmid p35S-cwIso

5

Eine DNA Sequenz, die für eine Saccharose-Isomerase kodiert, wurde aus dem Plasmid pCR-SucIso2 isoliert und mit dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzenzellen vermittelt sowie

- 10 einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens.

- Vor die kodierende Sequenz des Saccharoseisomerase-Gens wurde
- 15 außerdem ein für die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Gens (Proteinase-Inhibitor II-Gen aus Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.-No.: X04118) fusioniert. Dazu wurde das Saccharoseisomerase-Fragment aus dem Konstrukt pCR-SucIso2
- 20 über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI herausgeschnitten und in einen BamHI/SalI-geöffneten pMA-Vektor ligiert. Der Vektor pMA stellt eine modifizierte Form des Vektors pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) dar. Welche den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzen vermittelt, ein Signalpeptid des Proteinase-Inhibitors II aus Kartoffel, welches die Zielsteuerung des Fusionsproteins in die Zellwand vermittelt, sowie ein pflanzliches Terminationssignal enthält. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungs-
- 25 stelle des Octopin-Synthase Gens. Zwischen der Teilsequenz des Proteinase-Inhibitors und dem Terminationssignal befinden sich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, XbaI, SalI, PstI und SphI (in dieser Reihenfolge), welche die Insertion entsprechender DNA-Fragmente ermöglichen, so dass ein Fusion-
- 30 sprotein zwischen dem Proteinase-Inhibitor Signalpeptid und dem eingefügten Protein entsteht, welches dann in die Zellwand von transgenen Pflanzenzellen befördert wird, die dieses Protein exprimieren. Die Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso besteht somit aus den Fragmenten A, B und C (Fig. 1):

40

- A) Fragment A beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt (Franck (1980) Cell 21:285).

45

- 5 B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al., supra), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhapontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER) notwendige Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase Sequenz fusioniert.
- 10 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J. 2:419-426. GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

15 In p35S-cwIso (35S = 35S-Promotor, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhapontici* unter konstitutiver Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen und anschließend sekretiert.

20

Beispiel 4: Herstellung von Plasmid pB33-cwIso

Das Plasmid pB33-cwIso wurde unter Verwendung des binären Plasmids p35S-cwIso hergestellt. Dabei wurde der 35S-Promoter
25 gegen den Promotor des Klasse I Patatin-Gens (Rocha-Sosa et al (1989) EMBO J 8:23-29) ausgetauscht. Die Expressionskassette dieses Plasmids pB33-cwIso besteht somit aus den drei Fragmenten A, B und C (siehe Fig. 2):

30 A) Fragment A beinhaltet die Region -1512 bis +14 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle des Klasse I Patatin-Gens. Die Promotorregion wurde als DraI-Fragment in den mit SstI geschnittenen Vektor pUC18, dessen Enden unter Einsatz der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und somit geglättet
35 worden waren, ligiert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 aus dem Vektor pUC18 wieder ausgeschnitten und in das Plasmid p35S-cwIso kloniert, aus dem vorher der 35S CaMV-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und
40 Asp718 deletiert worden war.

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel, welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das
45 Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges

Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

- (C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426; GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

- In pB33-cwIso (B33 = Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhapontici* unter gewebe-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

Beispiel 5: Kartoffeltransformation und Selektion transgener Pflanzen

- 20 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara) wurden in 10 ml MS-Medium mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 5-minütigem, leichtem Schütteln wurden die Petrischalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Gibberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurde die Claforankonzentration im Medium halbiert. Eine weitere Woche Kultivierung erfolgte unter bekannten Bedingungen (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29).
- Unter Verwendung des pB33-cwIso Plasmids wurden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation insgesamt 36 kanamycin-resistente Kartoffelpflanzen regeneriert. Die Knollen dieser Pflanzen wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das rekombinante PalI Protein (Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364) auf palI Expression untersucht. Bei 25 Linien konnte palI Expression im Westernblot nachgewiesen werden. Ein Westernblot von repräsentativen Linien ist in Fig. 3 dargestellt.

Beispiel 6: HPLC-Analyse der transgenen pB33-cwIso-Kartoffeln

- Mit dem Ziel des Nachweises der in vivo Konversion von Saccharose in Palatinose wurden Knollenextrakte der transgenen Linien mittels HPLC hinsichtlich ihres Gehaltes an löslichen Kohlenhydraten untersucht. Die HPLC Analyse wurde nach der in Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Herstellung der Knollen Extrakte ist beschrieben

bei Sonnewald et al. (1992) Plant J 2:571-581. Die Resultate der HPLC Analyse sind in Fig. 4 dargestellt.

- Wie die Chromatogramme zeigen, führt die Expression der
- 5 Saccharoseisomerase in der Zellwand zu einer substantiellen Akkumulation von Palatinose in den Knollen der untersuchten pB33-cwIso-Linien. Der Wildtyp enthält keine Palatinose, wie ebenfalls aus den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist. Der Gehalt an löslichen Zuckern in transgenen Kartoffel-
- 10 knollen, die das Konstrukt pB33-cwIso enthalten, ist in Fig. 5 dargestellt. Der Gehalt an Palatinose in den Kartoffelknollen variiert zwischen den einzelnen transgenen Linien zwischen 1,7 $\mu\text{mol/g}$ FW (FW: "fresh weight" = Frischgewicht) (Linie 14) und 16 $\mu\text{mol/g}$ FW (Linie 5).
- 15
- Beispiel 7: Infektion von Karoffelscheiben mit *Alternaria solani*
- Alternaria solani* (bereitgestellt von Dr. Jürgen Sigrist, Zentrum für Grüne Gentechnik, Neustadt an der Weinstraße) wurden auf
- 20 PDA-Agar (Duchefa, Niederlande) für 14 Tage bei 16°C gehalten (PDA = Potato Dextrose Agar). Die Sporen wurden durch Abschaben in Wasser isoliert und die erhaltene Suspension durch Miracloth von festen Bestandteilen befreit. Die Sporenzahl wurde in einer Zählkammer (Thoma) bestimmt und auf 10000 Sporen/ml eingestellt.
- 25 25 μl (demnach 250 Sporen) wurden pro Kartoffelscheibe (1,5 cm Durchmesser) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die inokulierten Scheiben wurden anschließend bei 16°C inkubiert. Die Bonitur erfolgte optisch. Das Ergebnis nach 14-tägiger Inkubation ist in Fig. 6 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ist
- 30 das Wachstum des Pilzes auf transgenen Kartoffelknollen, die die Saccharoseisomerase exprimieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso

- 35
- Zur Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Lemmi9 Promotor Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:440-449) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-
- 40 Inhibitor II-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter die Kontrolle des "Feeding cell"-spezifischen Promotor gestellt.

- Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Lemmi9-Promotors wurde bereits demonstriert (Escobar C et al. (1999)
- 45 Mol Plant Microbe Interact 12:440-449). Das Plasmid pLemmi9-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (siehe Fig. 7):

56

- A) Fragment A beinhaltet den Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Das Fragment beinhaltet die Sequenz von 1417 bp vor dem Translationsstart (ATG) des Lemmi9-Gens und wurde als funktionelles Promoterfragment charakterisiert (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449, Accession Z69032). Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:
- Lem1: 5'atcGAATTCATAATTTAACCATCTAGAG 3' (SEQ ID NO: 28)
- Lem2: 5'atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG 3' (SEQ ID NO: 29)
- Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Lem1, EcoRI; Primer Lem2, Asp718.
- Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:
- genomische Tomaten-DNA (1 µg),
 - Primer Lem1 und Lem2 (jeweils 250 ng),
 - Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
 - 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).
- Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.
- B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapontici*, welches die

Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch ist ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5

- C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533)..

- 10 In pLemmi9-cwIso (Lemmi9 = Promotor des Lemmi9-Gens aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter Feeding cell-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15

Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Lemmi9-Promotors hergestellt (pLemmi9-GUS).

- 20 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pLemmi9-cwIso bzw. pLemmi9-GUS transformiert und ganze Kartoffelpflanzen wurden regeneriert.

- 25 Beispiel 9: Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso

Zur Herstellung des Plasmids p Δ 0.3TobRB7-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Δ 0.3TobRB7 Promotor (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223)

- 30 ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter Feeding cell-spezifische Kontrolle gestellt.

- Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Δ 0.3TobRB7-Promotors wurde bereits demonstriert (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223). Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase-Gens. Das Plasmid p Δ 0.3TobRB7-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (Fig. 8):

40

- A) Fragment A beinhaltet den Δ 0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*. Das Fragment beinhaltet die Region von -298 bp bis +76 des TobRB7-Gens befinden und als funktionelles Promotorfragment charakterisiert wurden (Opperman et al. (1994) Science. 263: 221-223, Acc.-No.: S45406) . Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN

45

amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

Tob1: 5'-GGAATTCAGCTTATCTAAACAAAGTTTAAATTC-3' (SEQ ID NO: 30)

5

Tob2: 5'-GGGTACCAGTTCTACTAGAAAAATGCCCC-3' (SEQ ID NO: 31)

Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Tob1, EcoRI; Primer Tob2, Asp718.

10

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

- genomische DNA aus Tabak (1 µg),
- Primer Tob1 und Tob2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

15

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

20

25

30

35

- B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhapsodici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

40

45

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

- 5 In p Δ 0.3TobRB7-cwIso (Δ 0.3TobRB7 = verkürzter Promotor des TobRB7-Gens aus Tabak, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter "Feeding cell"-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.
- 10 Analog wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) unter Kontrolle des Δ 0.3TobRB7-Promotors hergestellt (p Δ 0.3TobRB7-GUS).
- 15 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt p Δ 0.3TobRB7-cwIso bzw. p Δ 0.3TobRB7-GUS transformiert und Kartoffelpflanzen wurden regeneriert

20 Beispiel 10: Infektion der Pflanzen mit Nematoden

- Transformierte Pflanzen werden mit Hilfe von npt-spezifischen Primern über PCR bestätigt. Zur Infektion mit Nematoden werden die Stecklinge von transgenen Linien, die die Saccharoseisomerase
- 25 unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zuerst auf Medium mit Kanamycin angezogen und später in Töpfe mit steriler Erde transferiert. Die Pflanzen werden bei 22°C (16 h Tag/8 h Nacht) angezogen. Die Infektion der Pflanzen wird wie folgt durchgeführt: 3 ml einer Suspension
- 30 (ca. 500 J2-Larven) von Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) werden direkt neben den Stengeln der Pflanzen in die Erde inokuliert. Die Pflanzen werden nach 2 bis 3 Wochen aus den Töpfen entfernt und die Wurzeln gewaschen. Anschließend wird die gesamte Wurzel einer jeden Pflanze mit Hilfe eines Stereo-
- 35 mikroskopes untersucht und die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem von transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen verglichen.

- Transgene Pflanzen, die die Saccharoseisomerase unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zeigen
- 40 eine deutliche Resistenz gegenüber endoparasitären Wurzel-nematoden. Die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem dieser Pflanzen nach Nematodenbefall ist im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen signifikant reduziert.

45 Beispiel 11: In vitro Nematodenresistenz-Test

Materialien:

Pflanzen: Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara)
Nematoden: *Meloidogyne incognita*
Medium: modifiziertes Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt
5 mit Agar) bestehend aus micro und 1/2 macro-Elementen
einschließlich Vitaminen, Sucrose und Diachin-Agar (0,7%)
pH 5,8.

- 10 Pflanzen: Sterile transgene Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*
L. cv. Solara transformiert mit pA0.3TobRB7-cwIso bzw.
pLemmi9-cwIso) und entsprechende transgene Kontrollpflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara transformiert mit pA0.3TobRB7-GUS
bzw. pLemmi9-GUS) wurden in Gläsern mit jeweils mehreren Pflanzen
15 bereitgestellt. Ausgehend von jeder Pflanze wurden jeweils drei
Linien mittels Stengelabschnitten und nachfolgender Kultivierung
auf modifiziertem Murashige & Skoog Medium (MSm; verfestigt mit
Agar) generiert. Jede Linie wurde auf einer separaten 9 cm Petri-
schale ausgepflanzt. Die Pflanzen wurden für 2 bis 3 Wochen unter
20 einem Licht/Dunkel-Regim von 16h Licht / 8h Dunkelheit bei 25°C
gezüchtet.

Nematoden-Stammkultur:

- Nematoden wurden aus sterilen Stammkulturen gewonnen. M. inco-
25 gnita wurde monoxenisch in der Dunkelheit bei 25°C auf Wurzelex-
plantaten von *Cucumis sativus* gezüchtet, wie bei Wyss et al. be-
schrieben (Wyss U et al. (1992) *Nematologica* 38:98-111). Eier-
säcke wurden aus den Sterilkulturen gesammelt und auf einem Sieb
in einem Glastrichter mit sterilem Wasser plaziert. Die Trichter
30 wurden mit einem Platikschlauch verbunden, welcher mit einer
Klemme verschlossen wurde. Geschlüpfte Jungtiere wurden durch
Öffnen der Klemme und Ablassen der Suspension in kleine Gefäße
gewonnen. Die Viskosität der Suspension wurde durch Zufügen einer
Suspension von sterilem "Gel Rite" erhöht. Die Dichte der Nemat-
35 den in der Suspension wurde bestimmt und durch Zugabe von steri-
lem Wasser normiert.

Nematodeninfektion

- Sobald die Pflanzenwurzeln ein Wurzelsystem entwickelt hatten,
40 wurden die Wurzeln mit frisch geschlüpfen Jungnematoden im zwei-
ten Stadium (J2) infiziert. Zehn Tropfen mit jeweils 10 Jungtie-
ren wurden dabei auf jede Pflanze appliziert.

Auswertung:

- 45 Nach 2 bis 3 Wochen hatten die Nematoden die Wurzeln penetriert
und in den Kontrollpflanzen hatten sich Gallen gebildet. Gallen-
bildung wurde als Zeichen einer erfolgreichen Penetration und

61

Etablierung von Freßstellen in den Wurzeln herangezogen. Die Wurzeln der verschiedenen Pflanzenlinien wurden auf Gallen mikroskopisch untersucht und die Gallen auf der Petrischale vermerkt.

- 5 Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeigen die mit pΔ0.3TobRB7-cwIso bzw. pLemmi9-cwIso transformierten Kartoffellinien eine signifikante Verringerung der Gallenbildung. Dies bedeutet eine signifikante Minderung der Nematoden-bedingten Schädigung.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
5 mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei
nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
- a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder
10 einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
- b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen
- im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus -
die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht
15 oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase
beschrieben wird durch
- i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
20 oder 36, oder
- ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 36, oder
25
- iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein
gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die
30 Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch
eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine
Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz
35 gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
oder 36, und
- b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer
Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß
40 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 26
aufweisen, und
- c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
13, 15, 17, 19, 21 oder 35, und
45

63

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresesequenz von c) degeneriert ist, und
- e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 aufweisen, und
- f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 oder 35 hybridisieren.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promotors exprimiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder epidermis-spezifischen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare oder epidermis-spezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.

11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

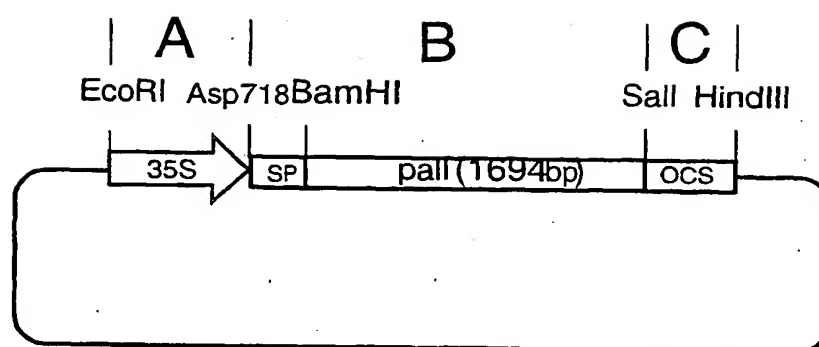


Fig.1

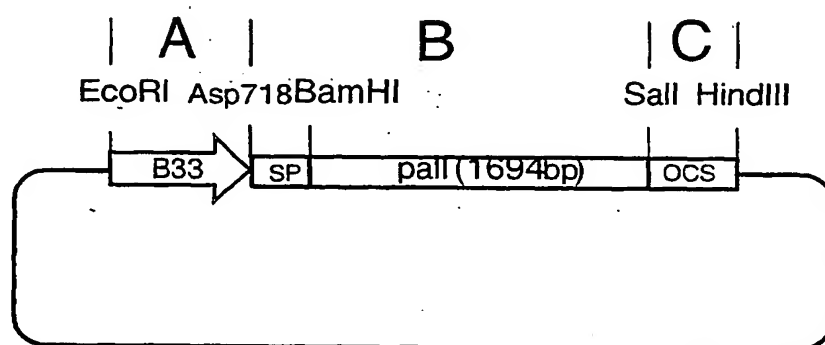


Fig.2